

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Identificación de las preferencias alimenticias de la fauna del género
Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) de la Estación de Biodiversidad
Tiputini**

Byron Alexis Mullo Naula

Sonia Zapata, Ph.D., Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Licenciado en Biotecnología

Quito, diciembre de 2014

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Identificación de las preferencias alimenticias de la fauna del género
Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) de la Estación de Biodiversidad
Tiputini**

Byron Alexis Mullo Naula

Sonia Zapata Mena, Ph.D.

Directora de Tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Miembro de Comité de Tesis

Gabriel Trueba Piedrahita, Ph.D.

Miembro de Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, diciembre de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política. Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Byron Alexis Mullo Naula

C. I.: 1717410714

Fecha: diciembre de 2014

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, a mis padres, a mi hermana y hermano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a Sonia Zapata por su apoyo y paciencia durante la elaboración de mi tesis y la culminación de mi carrera.

A María de Lourdes Torres y Gabriel Trueba por sus observaciones y correcciones.

A mis padres Aurora e Ignacio, por su amor, por el gran esfuerzo que han hecho por darme una buena educación, por los valores que me inculcaron y por ser un ejemplo de vida para mí.

A mis hermanos, Maribel y Josué, por su cariño y apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida.

A David Romo por sus consejos y guía durante el transcurso de mi carrera.

A Andrea Torres por su amistad, y por sus enseñanzas en los inicios de mis tesis.

A mi familia y amigos por su compañía, apoyo consejos y ánimo en los malos y buenos momentos dentro y fuera de la universidad.

A Leonela Clavijo por su amistad y amor, por el apoyo constante que me brinda para plantearme y lograr nuevas metas.

Resumen

Las especies del género *Culicoides* son insectos hematófagos de importancia médica y veterinaria y están distribuidas alrededor de todo el mundo con excepción de los polos y Nueva Zelanda. Entre el 25 y 30 de Octubre del 2013, se realizó colectas en la Estación de Biodiversidad Tiputini (TBS). Se colectó un total de 3853 especímenes de los cuales el 6,3% correspondió a hembras con ingesta de sangre reciente pertenecientes a 34 especies: *C. batesi*, *C. diabolicus*, *C. filarifer*, *C. fusipalpis*, *C. guttatus*, *C. hylas*, *C. equatoriensis*, *C. ginesi*, *C. glabrior*, *C. lahillei*, *C. limonensis*, *C. paraensis*, *C. quasiparaensis*, *C. spurius*, *C. metagonatus*, *C. mirsae*, *C. cáncer*, *C. discrepans*, *C. bajensis*, *C. beaveri*, *C. belemensis*, *C. benarrochi*, *C. bricenoi*, *C. castillae*, *C. daedaloides*, *C. dasyophrus*, *C. fieldi*, *C. fluvialis*, *C. leopoldoi*, *C. paucienfuscatus*, *C. pifanoi*, *C. rangeli*, *C. reticulatu* y *C. tetrathyris*. El análisis molecular del gen nuclear prepronociceptina (PNOC) permitió identificar las preferencias alimenticias de 11 especies sin rol vectorial conocido hasta el momento. Las fuentes de alimentación fueron: *Ateles belzebut* (mono araña), *Choloepus didactylus* (oso perezoso), *Homo sapiens* (humano), *Lagothrix poeppigii* (mono chorongo) y un ungulado (probablemente un venado). El presente estudio provee información sobre la distribución de especies del género *Culicoides* de la TBS. Además, constituye un aporte al conocimiento de las fuentes de alimentación de ciertas especies.

Abstract

The species of the genera *Culicoides* are bloodsucking midges which have veterinary and medical importance and are distributed all around the world except in the poles and New Zealand. In 2013 from the 25th of October until 30th of October, collections were made in Tiputini Biodiversity Station (TBS). A total of 3853 of culicoides were collected, and 6,3% were females with a fresh bloodmeal which belonged to 34 species: *C. batesi*, *C. diabolicus*, *C. filarifer*, *C. fusipalpis*, *C. guttatus*, *C. hylas*, *C. equatoriensis*, *C. ginesi*, *C. glabrior*, *C. lahillei*, *C. limonensis*, *C. paraensis*, *C. quasiparaensis*, *C. spurius*, *C. metagonatus*, *C. mirsae*, *C. cáncer*, *C. discrepans*, *C. bajensis*, *C. beaveri*, *C. belemensis*, *C. benarrochi*, *C. bricenoi*, *C. castillae*, *C. daedaloides*, *C. dasyophrus*, *C. fieldi*, *C. fluvialis*, *C. leopoldoi*, *C. paucienfuscatus*, *C. pifanoi*, *C. rangeli*, *C. reticulatu* y *C. tetrathyris*. The molecular analysis of the gen prepronociceptin (PNOC) allowed the identification of feeding preferences of 11 species which are not known as vectors nowadays. The bloodmeal sources were: *Ateles belzebut* (spider monkey), *Choloepus didactylus* (sloth), *Homo sapiens* (human), *Lagothrix poeppigii* (woolly monkey) and an ungulate (perhaps a deer). This research provides information about the distribution of the species of the genera *Culicoides* in the TBS. Also, this study contributes to the knowledge of the bloodmeals of certain species.

Tabla de Contenidos

1.	INTRODUCCIÓN-----	11
1.1	Taxonomía e Identificación del género <i>Culicoides</i> -----	12
1.1.1	Criterios morfológicos para la identificación de especies -----	13
1.2	Ciclo de vida -----	16
1.3	Hábitos alimenticios -----	19
1.4	Identificación Molecular de Patrones de Alimentación -----	22
1.4.1	Patrones de alimentación en Ecuador -----	24
1.5	Los culicoides como vectores -----	24
1.6	Culicoides en Ecuador -----	27
2.	JUSTIFICACIÓN-----	28
3.	OBJETIVOS -----	29
3.1	Objetivo General -----	29
3.2	Objetivos Específicos -----	29
4.	ÁREA DE ESTUDIO-----	30
5.	MATERIALES -----	30
5.1	Colección de especímenes -----	30
5.2	Separación de especímenes -----	31
5.3	Identificación de especies -----	31
5.4	Extracción de ADN -----	32
5.5	Amplificación de ADN -----	32
5.6	Secuenciamiento -----	33
5.7	Análisis de secuencias -----	33
6.	MÉTODOS -----	33
6.1	Colección entomológica. -----	33
6.2	Separación de Muestras -----	34
6.3	Montaje en placa de culicoides -----	34
6.4	Identificación morfológica de especies -----	35
6.5	Análisis Molecular -----	36

6.5.1 Extracción de ADN -----	36
6.5.2 Amplificación de ADN -----	36
6.5.3 Secuenciamiento-----	37
1. RESULTADOS -----	37
7.1 Colección Entomológica -----	37
7.2 Análisis Molecular de las Fuentes de Alimentación -----	39
8. DISCUSIÓN-----	40
9. CONCLUSIONES -----	49
10. RECOMENDACIONES-----	50
11. BIBLIOGRAFÍA -----	52
12. TABLAS -----	61
13. FIGURAS -----	65
14. ANEXOS-----	71

1. INTRODUCCIÓN

Los culicoides son un género de insectos hematófagos que pertenecen al orden Díptera, suborden Nematóceras y familia Ceratopogonidae (Wirth & Hubert, 1989; Blackwell, 2004). Esta familia se encuentra distribuida en todo el mundo, con aproximadamente 78 géneros y más de 4000 especies descritas. El género *Culicoides* alberga la mayor cantidad de especies descritas (Lacková et al., 2013; Lehan, 2005). Hasta el año 2002 se tenía un registro de 1 000 especies (Mullen & Durden, 2002; Ortiz & León, 1955). Sin embargo, en la actualidad se estima que existen más de 1 400 especies de *Culicoides*, entre las cuales se encuentran especies que son vectores de enfermedades de importancia médica y veterinaria (Mullen & Durden, 2002; Oem et al., 2012; Beckenbach & Borkent, 2003; Borket & Spinelli, 2007).

Los culicoides se encuentran entre los dípteros hematófagos más pequeños, usualmente tienen una longitud de 1-2.5mm (Lehan, 2005). Su cabeza es pequeña, tiene ojos grandes y antenas de 14-15 segmentos. Su cuerpo tiene una coloración oscura. Cada especie del género *Culicoides* presenta patrones de pigmentación específicos en sus alas, los mismos que tienen utilidad en la identificación taxonómica (Wirth et al., 1988; Borket & Spinelli, 2007).

Debido a su versatilidad para adaptarse a diferentes ambientes, las especies del género *Culicoides* se encuentran distribuidas alrededor de todo el mundo con excepción de la Antártica y Nueva Zelanda (Oem et al., 2012; Abu et al., 2002; Borket & Spinelli, 2007).

En la región del neotrópico se ha reportado que existen alrededor de 266 especies. En estas zonas cálidas pueden estar presentes en gran cantidad durante todo el año (Veggiani et al., 2012; Marino et al., 2013; Wirth et al, 1988; Lehan, 2005).

El comportamiento nictameral varía según cada especie. La mayoría de especies son crepusculares aunque la etapa de mayor actividad es en horas de la noche (Lehan, 2005). La actividad de los culicoides también se ve influenciada por el ambiente, temperatura, humedad e intensidad de la luz.

1.1 Taxonomía e Identificación del género *Culicoides*

Los Ceratopogonidos están divididos en cuatro familias: Leptoconopinae, Forcipomyiinae, Dasyheleinae y Ceratopogoninae. Con excepción de Dasyhelinae, cada subfamilia incluye especies que se alimentan de sangre de vertebrados. Sólo cuatro géneros son reconocidos por ser vectores de enfermedades en humanos y otros animales (Lehan, 2005; Mullen & Durden, 2002; Wirth & Hubert, 1989).

Dentro de la familia Ceratopogonidae se han identificado 78 géneros. Los géneros que contienen especies hematófagas son: *Leptoconops* (distribución mundial), *Austroconops* (sudoeste de Australia), *Forcipomyia* (distribución mundial) y *Culicoides* (distribución mundial), el resto de géneros se alimentan de otros insectos (Lehan, 2005; Mullen & Durden, 2002; Wirth & Hubert, 1989).

Para las especies neotropicales de *Culicoides* se han reportado un total de 15 subgeneros, 13 grupos de especies y finalmente un grupo de especies sin clasificación. Los subgéneros con mayor número de individuos son *Hoffmania* y *Haematomuidium* (Borkent & Spinelli, 2007).

Aunque se han registrado más de 4 000 especies de Ceratopogonidae, se estima que existen unas 15 000 especies en el planeta. Por ejemplo, en los Andes de Sur América, una región que es conocida por su alta diversidad de organismos, se ha colectado pocos especímenes (Russell, Otranto, & Wall, 2013). A pesar de que muchos especialistas creen que basta con restringir los estudios a especies que pueden transmitir enfermedades, es claro que un entendimiento de las otras especies provee importante información comparativa que ayuda a una mejor interpretación de las características de las especies de importancia médica y veterinaria (Russell et al., 2013).

La identificación morfológica es la técnica más común aplicada en la clasificación de los culicoides (Uhlmann et al., 2014). Al considerar únicamente criterios morfológicos, este tipo de categorización se vuelve subjetivo y por lo tanto se puede tener un diferente número de especies y subgéneros dependiendo del autor que realice la clasificación (Swanson, 2012). Otra desventaja es que esta técnica requiere mucho tiempo, además es necesaria la disección en microscopio y el montaje de las diferentes partes del cuerpo de los culicoides en una placa portaobjetos (Uhlmann et al., 2014). Sin embargo, actualmente existe una lista que considera a las especies de diferentes sitios alrededor del mundo, en la que se cataloga a las diferentes especies del género *Culicoides* bajo los mismos criterios y de esa forma se trata de evitar las clasificaciones parciales que se han hecho en diferentes regiones (Borkent, 2012).

1.1.1 Criterios morfológicos para la identificación de especies

La morfometría de la cabeza, el tórax, las alas, y abdomen son utilizadas para confirmar la identidad de las especies de *Culicoides* (Borkent & Spinelli, 2007; Russell et al., 2013). La cabeza tiene la forma de una esfera alargada con el borde anterior más o menos aplanado.

Tiene ojos grandes y reniformes que son cercanos a la base de la antena. La distancia entre los ojos y las antenas suele emplearse para distinguir especies. Las antenas son moniliformes y se componen de 15 segmentos ó 14 en algunos machos; la base tiene forma de anillo y se inserta en la cabeza. En los machos, los dos primeros segmentos son abultados pero en las hembras son poco abultados. Los segmentos de las antenas tienen órganos sensoriales llamadas sensilas cuya distribución varía entre especies. Al parecer el número de sensilas puede ser utilizado como indicador de preferencia de hospedadores; las que tienen un bajo número de sensilas prefieren a los mamíferos mientras que tienen una mayor cantidad, son usualmente ornitofílicos (Wirth & Hubert, 1989).

Las estructuras bucales tienen un tamaño similar a la cápsula de la cabeza. Es más fuerte en las hembras que en los machos debido a que deben perforar la piel de los hospedadores para succionar la sangre. El aparato bucal está constituido por: labrum – epifaringe, un par de cuchillas, mandíbula, las maxilas, la hipofaringe, el labio y el cibarium (Wirth, 1951; Gualapuro, 2013).

Los palpos constan de 5 segmentos lo cuales están incrustados dentro de la cabeza. El tercer segmento se conoce como foseta y es utilizado en la identificación taxonómica ya que tiene tres formas. Para identificar la especie se debe calcular la razón de la longitud y el grosor de la foseta (Wirth, 1951; Gualapuro, 2013).

El tórax es moderadamente ancho, arqueado hacia el interior y se proyecta ligeramente sobre la cabeza. Tiene un par de pequeñas depresiones en la parte posterior conocidas como hoyos humerales (Wirth, 1951). Contiene tres segmentos, protórax, mesotórax y metatórax. Un disco

del metatórax está ornamentado con un patrón distintivo (Wirth & Hubert, 1989; Swanson, 2012).

Las alas son la estructura determinante en la identificación de los culicoides. Tienen pequeñas vellosidades llamadas microtriquias las cuáles varían en tamaño y pigmentación para dar un patrón geométrico característico de puntos y bandas claras y oscuras. El patrón de colores es característico para cada especie y es de gran importancia en la clasificación. En los machos las alas son alargadas y estrechas y no hay mucho contraste entre las zonas claras y oscuras (Borkent & Spinelli, 2010).

Las alas están compuestas por venas, celdas y elementos anexos. Se distinguen 7 nervaduras principales: vena costal (C), subcostal (ssC), radial (R), ramal anterior (R_{1+2}), ramal posterior (R_{3+4+5}), media M, ramal anterior M_1 , ramal posterior M_2 , radio-medial (rm), cubital (Cu), y Anal ramal An1, anal ramal An2 (Borkent & Spinelli, 2010).

Las celdas están formadas por los cruces entre las venas y los bordes de las alas. Se distinguen las siguientes: celda subcostal (ssc), basal (b), radial (r, r_1 , r_2), media (m, m_1 , m_2), cubital (cu) y anal (an) (Wirth W. , 1951; Gualapuro, 2013). Finalmente, los elementos anexos son las microtriquias (vellosidades pequeñas), macrotriquias (vellosidades grandes) y cerdas (Wirth W. , 1951; Gualapuro, 2013).

En las hembras se observa la presencia de una estructura llamada spermateca la cual está constituida de 1-4 ovarios que están conectados por oviconductos en cuya porción final se encuentra un anillo esclerotizado, el cuál varía en forma y tamaño y por lo tanto se utiliza en la determinación de especies (Wirth & Hubert, 1989; Gualapuro, 2013).

En los machos se observa el hipopigium que está formado por: aedeagus (pene), parámero, cercus, esterno, tergo, lamella, estilo, coxilo y apoderma. Para la identificación morfológica se observa las dimensiones, forma y color del aedeagus; mientras que del cercus y de los parámetros se observa el tamaño y grosor (Wirth & Hubert, 1989; Gualapuro, 2013).

1.2 Ciclo de vida

Los culicoides pasan por diferentes etapas de desarrollo hasta lograr una metamorfosis completa (Figura 1). En la primera etapa se forma el huevo, luego atraviesa por cuatro estados larvales, posteriormente se forma la pupa y finalmente se desarrolla el adulto (Borkent & Spinelli, 2007; Russell et al., 2013). El proceso de desarrollo depende de la temperatura, a 17°C se desarrolla en 7 semanas, a 30°C se desarrolla en 2 semanas, en condiciones de laboratorio. En el campo, en zonas tropicales el tiempo promedio de desarrollo es de 2-3 meses mientras que en zonas frías puede durar de 1 a dos años (Russell et al, 2013).

Los huevos son pequeños y alargados con una longitud de 250-500 μm , tienen una forma de banana y están cubiertos por pequeñas proyecciones que aparentemente tienen una función en la respiración. Para la ovoposición la hembra busca lugares húmedos o acuosos (Painter, 1927). Una vez encontrado el lugar adecuado, la hembra coloca de 30 hasta 450 huevos (Blackwell, 2004; Russell et al., 2013). El tiempo de eclosión de los huevo ocurre entre 2-7 días, aunque algunas especies eclosionan a los 7-8 meses (Russell et al., 2013; Mullen & Durden, 2002; Painter, 1927).

El momento de la eclosión emerge una la larva vermiforme que se desarrolla en cuatro etapas, con un tiempo que varía entre dos semanas y más de un año, dependiendo de la especie, latitud, y época del año. Muchas especies del género *Culicoides* son capaces de mantenerse en

estado larvario de 7 a 8 meses (Mullen & Durden, 2002; Marquardt et al., 2004; Russell et al., 2013).

Las larvas de los culicoides, son típicamente largas y finas, con una longitud de 2 a 5 mm en su etapa madura. El cuerpo es translúcido y algo blanquecino. El tórax está usualmente marcado por un patrón de pigmentación subcutáneo. Los segmentos torácicos y abdominales tienen un tamaño similar, lo cual contribuye a la forma cilíndrica del cuerpo. Las partes bucales de la larva están compuestas por un par de mandíbulas no opuestas (Mullen & Durden, 2002). Los lugares preferidos por las larvas son espacios con gran cantidad de agua o humedad, como pantanos y lodazales (Walker, 1977; Szadziwski et al., 1997) (Figura 2).

La pupa se forma en la cuarta etapa larval. La cabeza y el tórax están fusionados, el abdomen termina en un par de espinas caudales que le sirve para moverse sobre un sustrato (Russell et al., 2013). Las pupas son típicamente de color café, con un par de cuernos respiratorios sobresalientes al final de la parte anterior. Los tubos respiratorios repelen el agua, lo cual permite mantenerse en la superficie donde pueden obtener aire durante la metamorfosis. La etapa de pupa generalmente ocurre cerca de la superficie del sustrato y dura de 2 a 10 días (Mullen & Durden, 2002). Durante esta etapa de desarrollo, la pupa no se alimenta (Russell et al., 2013; Marquardt et al., 2004) (Figura 2).

Los culicoides adultos son diminutos, usualmente su cuerpo mide de 1 a 2.5 mm. Sus partes bucales están adaptadas para perforar tejidos y están bien desarrolladas para succionar sangre. En las hembras las partes bucales están rodeadas por un apéndice llamada probóscide, la cual es relativamente corta, casi del mismo tamaño de la cabeza. Las mandíbulas contienen una fila de dientes en el borde interno, que son usados para lacerar la piel durante la picadura. Las

partes bucales en los machos son pequeñas y no son usadas para la alimentación de sangre. Asociado a las partes bucales están un par de palpos maxilares de 5 segmentos cada uno (Mullen & Durden, 2002) (Figura 3).

La antena del adulto tiene 15 segmentos, divididos en una parte basal, un pedicelo alargado y 13 flagelómeros. Los segmentos de la antena contienen diferentes números de pequeños hoyos sensitivos. El número de segmentos con estos hoyos parece tener correlación con las preferencias alimenticias. Las especies que se alimentan principalmente de aves, generalmente tienen más hoyos sensitivos en comparación de los que se alimentan de mamíferos. En los machos, los flagelómeros 1-8, poseen vellosidades que incrementan la sensibilidad como mecano receptores y les da una apariencia plumosa. Las alas tienen una venación característica que distingue a los ceratopogonidos de otros grupos (Mullen & Durden, 2002).

Las hembras adultas, generalmente requieren alimentarse de sangre para el desarrollo de huevos. Sin embargo, también existen hembras autógenas las cuales tienen los nutrientes suficientes para desarrollar sus huevos sin necesidad de sangre durante el primer ciclo gonotrópico. El desarrollo de los huevos requiere de 7- 10 días aunque también puede ser de 2-3 días. Las hembras que son autógenas tienden a producir menos cantidad de huevos (Mullen & Durden, 2002). El tiempo de vida de cada generación puede ser tan corto como 2 semanas, pero típicamente es de 6 semanas (Mullen & Durden, 2002; Blackwell, 2004; Wirth & Hubert, 1989).

Aunque se han encontrado especies que producen una generación por año, la mayoría producen muchas generaciones. Usualmente cada especie presenta un patrón característico de abundancia de adultos en cierta época del año (Mullen & Durden, 2002).

1.3 Hábitos alimenticios

Los culicoides se encuentran en diversos tipos de hábitats, lo cuáles incluyen pantanos, estanques, ríos, lodazales, huecos de árboles y otras cavidades naturales en maderas (Mullen & Durden, 2002; Service, 2012).

La evolución de la alimentación de sangre de artrópodos es bien reconocida como una adaptación llena de retos como por ejemplo: encontrar hospedador, evadir la detección del hospedador, lograr penetrar la piel de los vertebrados, y evadir la respuesta inmune del hospedador (Benoit et al., 2011).

Se dispone de un registro de fósiles de *Culicoides* de hace 90 millones de años. Algunos de estos fósiles tienen estructuras bucales que sugieren que en esa época ya se alimentaban de sangre de vertebrados, lo que indica que la relación de los *Culicoides* y hospedadores es muy antigua (Marquardt et al., 2004).

Muchos (ceratopogonidae) son predadores, se alimentan de protozoarios, rotíferos, oligoquetos, nemátodos, estados inmaduros de insectos, y otros invertebrados acuáticos o semiacuáticos. Otros se alimentan de detritos, bacterias, hongos, algas verdes, diatomeas, y otros materiales orgánicos. Basados en experimentos de alimentación y observaciones directas, se supone que muchas especies son omnívoras y se alimentan oportunistamente de gran variedad de fuentes. Por ejemplo los miembros del complejo *C. variipennis* se alimentan de microorganismos; sin embargo, completan su desarrollo cuando se alimentan de nemátodos. Para casi todas las especies, la dieta natural y los requerimientos nutricionales son desconocidos (Mullen & Durden, 2002; Service, 2012; Lehan, 2005).

En la época de larva, los culicoides son generalistas, pueden alimentarse de nematodos en el día y de algas en la noche (Mullen & Durden, 2002; Blackwell, 2004; Wirth & Hubert, 1989). Como adultos, machos y hembras, se alimentan de néctar y plantas. Esto sirve como fuente de energía para volar e incrementa la longevidad especialmente en las hembras. Únicamente las hembras se alimentan de sangre. Como en otros insectos hematófagos, la sangre es necesaria para el desarrollo de los huevos y la subsecuente ovoposición. Las hembras laceran la piel y los capilares interiores con sus mandíbulas, lo que provoca que la sangre se filtre en los tejidos cercanos. Desde ahí se transporta hacia la parte anterior del intestino por acción de la bomba faríngea y luego se transporta al intestino medio. Luego de alimentarse la hembra vuela a la vegetación más cercana o algún otro lugar que ofrezca protección, y ahí reposa por varios días mientras sus huevos se desarrollan (Mullen & Durden, 2002; Boorman, 1993; Lehan, 2005).

Muchas especies se alimentan principalmente de sangre de mamíferos, mientras que otras especies prefieren las aves, reptiles o anfibios. Mientras algunos tienen un hospedador específico, otros son considerados generalistas y se alimentan en función de la disponibilidad del hospedadores (Mullen & Durden, 2002). En algunos casos los machos y las hembras se encuentran en un hospedador, y se aparean luego de que la hembra se ha alimentado de la sangre del hospedador (Mullen & Durden, 2002; Marquardt et al., 2004).

El grado de asociación entre el vector y la fuente de sangre es una herramienta importante para predecir la capacidad vectorial y de transmisión de patógenos. El entender estos patrones de alimentación puede contribuir a un mejor conocimiento de la transmisión de patógenos, y así se podrían diseñar estrategias para el control de posibles vectores. Adicionalmente, la selección del hospedador está influenciada por preferencias innatas y factores

medioambientales, tales como la diversidad de hospedadores, densidad y distribución en el campo (Garros et al., 2011).

Se sospecha que la mayoría de especies del género *Culicoides* tienen afinidad por la sangre de mamíferos domésticos y salvajes como por ejemplo: ovejas, cabras, caballos, humanos. Además, algunas especies se alimentan de reptiles y sapos (Garros et al., 2011; Lassen et al., 201; Ninio et al., 2011). También existen especies que son generalistas; por ejemplo, *C. festivipennis* y *C. obsoletus*. Éstas especies generalistas son de especial interés ya que son capaces de alimentarse de diferentes grupos de vertebrados, y por lo tanto, pueden facilitar el surgimiento de enfermedades. Adicionalmente, bajo condiciones ecológicas no favorables o alteradas, incluso los vectores especializados pueden alimentarse de hospedadores menos óptimos (Alarcon et al., 2012).

La mayoría de los culicoides son exófagos y no atacan a sus hospedadores en lugares cerrados. Sin embargo, se ha observado endofagia en algunas especies que están atraídas a mamíferos. La recurrente necesidad de sangre crea una situación en la cual varios patógenos pueden ser transmitidos (Lassen et al., 2012). A pesar de que se hacen estudios para determinar los patrones de alimentación, las preferencias de hospedadores de la mayoría de los culicoides todavía permanecen desconocidas (Pettersson et al., 2013).

La distancia que pueden viajar los culicoides es muy variable, depende del éxito de encontrar una pareja, disponibilidad de hospedadores, y las condiciones ambientales. Estudios de recaptura, indican que la distancia viajada por muchas hembras es de 2 km. La distancia recorrida por los machos es mucho más corta, usualmente menos de la mitad de la distancia de las hembras (Mullen & Durden, 2002).

Los culicoides adultos son detectados únicamente cuando están volando. Generalmente, están en busca de fuentes de sangre, pero también pueden estar buscando lugares para la ovoposición, o llegando y saliendo de su lugar de descanso. Así, los culicoides pasan más del 90% del tiempo descansado, tiempo durante el cual desarrollan sus oocitos hasta que alcanzan un estado en el que necesitan alimentarse de sangre, digieren la sangre de la que se han alimentado y desarrollan los huevos (Lassen et al., 2011).

1.4 Identificación Molecular de Patrones de Alimentación

La Identificación de las fuentes de sangre, provee información de las preferencias alimenticias ó de patrones de alimentación de las especies del género *Culicoides* en la naturaleza. Esta información proporciona indirectamente datos que muestran que reservorios podrían ser significativos en enfermedades transmitidas por vectores (Calvo et al., 2012; Ngo & Kramer, 2003). La identificación de reservorios de enfermedades transmitidas por vectores es importante para establecer una eficiente estrategia de control. La colección de animales salvajes para el aislamiento de estos patógenos es el método ideal para su identificación. Sin embargo, este método toma mucho tiempo y puede ser difícil en ambientes como la Amazonía (Haouas et al., 2007).

Históricamente, los estudios de patrones de alimentación de sangre, han utilizado ensayos que implican reacciones antígeno-anticuerpo, lo que requiere anticuerpos policlonales que respondan a los componentes de la sangre de hospedadores potenciales. La preparación de los anticuerpos contra cada hospedador potencial, es muy difícil y laboriosa, además los pasos de pre-absorción son necesarios para evitar reacciones cruzadas. Adicionalmente, a pesar de los largos tiempos de pre-absorción, los ensayos con anticuerpos sólo son capaces de identificar la

fuelle de la sangre hasta el nivel de orden. Por lo tanto, estos ensayos no se pueden utilizar para estudiar los perfiles de las fuentes a un nivel de especie (Lee et al., 2002).

Aunque estos métodos han proporcionado información importante sobre la identidad de los hospedadores vertebrados, éstos consumen mucho tiempo y no tienen mucha sensibilidad (Maleki-Ravasan et al., 2009).

La introducción de la técnica de PCR provee una aproximación más directa para la identificación del hospedador ya que no se necesita colectar suero ni producir anticuerpos. Adicionalmente, debido a que la sangre que se encuentra en el abdomen de las especies del género *Culicoides* está presente en pequeñas cantidades ($> 30 \mu\text{l}$ de sangre), es de mucha utilidad un ensayo de alta sensibilidad (Ngo & Kramer, 2003).

El gen mitocondrial del citocromo B ha sido utilizado exitosamente en estudios de preferencias tróficas de garrapatas, moscas negras, y mosquitos (Kirchgatter et al, 2014; Petterson et al, 2013). Este gen tiene secuencias con polimorfismos interespecíficos que sirven para determinar el género y especie de la fuente de alimentación. Una de las desventajas del gen del citocromo B es la co-amplificación de ADN de vertebrados con ADN de artrópodos (Townzen et al, 2008; Hebert et el, 2003; Lassen et al, 2012).

Por otro lado, el gen nuclear Prepronociceptina (PNOC) ha sido utilizado en estudios filogenéticos de mamíferos (Murphy et al, 2001; Haouas et al., 2007; Ninio et al., 2011). Sin embargo, también ha demostrado ser útil en la determinación de las fuentes de alimentación de artrópodos hematófagos. El gen PNOC tiene un origen evolutivo común con 3 precursores péptidos opioides endógenos: preproencefalina, preprodinorfina y prepropiomelanocortina (Mollereau et al, 1996).

El gen PNOC está situado en el brazo corto del cromosoma humano 8 (8p21). Es transcrito en el cerebro, médula espinal, y en menor cantidad en los ovarios. Se ha encontrado que codifica nocistatin, nociceptin y nocII/III. Adicionalmente, es un gen de copia única lo que permite una identificación de la fuente de sangre en un 100% por secuenciación directa con más de 64 especies de mamíferos publicados en el Gen Bank (Ninio et al., 2011).

La identificación de la sangre de hospedadores por métodos moleculares se ve limitada por la cantidad y calidad de ADN del hospedador en el abdomen del insecto. Luego de alimentarse, la digestión de la sangre dentro del intestino del insecto promueve la degradación del ADN. Por lo tanto, a medida que aumenta el nivel de digestión, el éxito en la identificación de la fuente de alimentación puede disminuir (Martínez-de la Puente et al., 2013).

1.4.1 Patrones de alimentación en Ecuador

En Ecuador, el gen PNOC para determinar las fuentes de alimentación en *Culicoides* fue utilizado por primera vez en un estudio realizado por Torres (2014). En este estudio, se identificó las fuentes de alimentación de 18 especies de *Culicoides* en las provincias Pichincha, Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Bolívar y Manabí. Los culicoides se alimentaron principalmente de *Bos Taurus* (vaca), *Equus caballus* (caballo), además se reportó por primera vez que los culicoides se alimentan de sangre de *Choloepus didactylus/hoffmani* (oso perezoso); finalmente, se encontró por primera vez que *C. hylas* se alimenta de sangre de *Homo sapiens* (Humano) (Torres, 2014).

1.5 Los culicoides como vectores

La importancia de los culicoides en el ámbito de la salud no se debe solamente a la molestia de la picadura sino a que son vectores de enfermedades (Veggiani et al., 2012; Drotman, 2014).

Algunas especies del género *Culicoides* son transmisores de varias enfermedades causadas por virus como: el virus de la lengua azul (VLA), el virus akabane, enfermedad de caballos africanos, enfermedad epizootica hemorrágica y fiebre bovina (Mullen & Durden, 2002; Becker et al., 2013; Lehmann et al., 2012). Recientemente, *C. obsoletus* ha sido identificada como vector del virus Schmallenberg. Además, son vectores de filarias como *Mansonella perstans* y *Mansonella streptocerca* en África. En América, *C. furens* es vector de *Manzonella ozzardi*. Además es transmisor del virus de Oropouche en Colombia, Brasil, Panamá, Perú y Trinidad y Tobago (Service, 2012; Pages et al., 2014).

El virus de la lengua azul (VLA) es considerado de alta importancia veterinaria. La lengua azul es una enfermedad no contagiosa de animales salvajes y domésticos. Se han identificado 24 serotipos de este virus alrededor del mundo (Lacková et al., 2013). En 1998, el VLA se consideraba una enfermedad exótica del sur de Europa. Sin embargo, con el transcurso de los años se dispersó por muchos países del mediterráneo y el Norte de Europa. Esta expansión del virus de la lengua azul más allá de su rango geográfico tradicional propone la siguiente pregunta: ¿Qué determina el apareamiento y expansión de virus que son transmitidos por vectores? Adicionalmente, en la década de los noventa se creía que sólo una especie (*C. imicola*) era vector del VLA, pero luego se encontró que existían al menos 3 especies vectoras (Ayllón et al., 2014). El virus de la lengua azul está presente en diferentes países alrededor del mundo. En América se han identificado los siguientes vectores: *C. variipenis*, *C. sonorensis* y *C. insignis*. En Australia y Asia: *C. imicola*, *C. brevitarsis*, *C. actoni*, *C. wadai* y *C. fulvus*. En Europa los vectores son: *C. imicola*, *C. obsoletus* y en África *C. imicola*, *C. milnei*, *C. oxystoma* (Bartsch et al., 2009; Russell et al., 2013; Torres, 2014).

El virus de Oropuche es el único virus transmitido a humanos cuyo vector es *C. paraensis* que está ubicado principalmente en América del Sur (Boorman 1993; Lager 2004; Barstch 2009). En general, los vectores dependen de un hospedador para su supervivencia. El conocimiento de la ecología básica del vector, como la determinación de la fuente de alimentación, es necesario para entender la epidemiología de los vectores. Posteriormente, esta información puede ayudar a determinar el patógeno causante enfermedad hasta la identificación de su modo de transmisión (ruta) entre vectores y hospedadores (Mullen & Durden, 2002; Petterson et al, 2013).

Existen indicios de que los artrópodos y los virus que transmiten son sensibles a los cambios de temperatura y otros factores ambientales (Mayo et al., 2014). La prevalencia y transmisión de estos virus depende del vector y la distribución de los hospedadores, los que a su vez dependen de factores climáticos y geográficos (Oem et al., 2012). Además, los riesgos de aparición de enfermedades dependen de la estación del año, y la distribución espacial de los culicoides (Veronesi et al., 2013).

La modificación antropogénica del medio ambiente altera la composición de comunidades y la dinámica de poblaciones de muchos organismos que incluyen a vectores que son dípteros (Muller et al., 2014). Debido a los impactos económicos y en salud es necesario determinar la distribución de los insectos vectores no solo para control de enfermedades sino también para propósitos de predicción (Meiswinkel et al., 2004). Un conocimiento detallado del comportamiento de los culicoides, en cada región, es necesario para el conocimiento e implementación de estrategias de control de vectores (Veggiani et al., 2012; Oem et al., 2012; Acevedo et al., 2010; Wittmann & Baylis, 2000).

1.6 Culicoides en Ecuador

El registro actual de la fauna del género *Culicoides* presente en Ecuador, muestra la presencia de 65 especies de este género. Dentro de éstas se han identificado algunas especies antropofílicas: *C. ginesi*, *C. neoparaensis*, *C. paraensis*, *C. diabolicus*, *C. castillae*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. acotylus*, *C. belemensis*, *C. pachymerus*, *C. pifanoi*, *C. reticulatus*, *C. deanei* (Ortiz & Leon, 1955; Dillon & Lane, 1993; Borkent & Spinelli, 2007; Gualapuro, 2013). Además se han encontrado especies identificadas como vectores de la Fiebre Catarral Ovina en rumiantes (*C. insignis*) y de la Fiebre de Oropuche en humanos (*C. paraensis*).

En el Parque Nacional Yasuní, el subgénero *Hoffmania* es más prevalente. Además, en esta zona existe una gran cantidad de especies del género *Culicoides* posiblemente debido a las condiciones geográficas y climáticas favorables que contribuyen a tal diversidad (Gualapuro, 2013).

Finalmente, en el presente estudio se determinó las fuentes de alimento (sangre) de las hembras culicoides capturadas en la Estación de Biodiversidad Tiputini. Se colocaron trampas de luz, se almacenaron todos los especímenes capturados y luego se procedió a separar los culicoides machos, hembras con ingesta de sangre y sin ingesta de sangre. A las hembras con ingesta de sangre se las identificó morfológicamente. Enseguida, se extrajo el ADN de la sangre presente en el abdomen de las hembras culicoides y después se procedió a amplificar el gen PNOC. Las muestras que amplificaron el gen PNOC fueron enviadas a secuenciar en la empresa Coulter Genomics en Inglaterra. En último lugar, se procedió a analizar las secuencias con el software MEGA 6 y se comparó las secuencias con la base de datos BLAST para determinar el origen de la sangre.

2. JUSTIFICACIÓN

Factores como el cambio climático, aumento de la frontera agrícola y pecuaria, deterioro de ecosistemas y globalización favorecen la migración de vectores y patógenos. Un ejemplo de esto es la migración de *C. imicola* (vector del VLA) desde África al norte de Europa. En Latinoamérica, brotes como el de Fiebre Catarral Ovina (VLA), Brasil, y Argentina tienen un alto impacto económico. Además, se reportan más casos de personas infectadas con el virus del Oropouche (OROV) en la cuenca amazónica de países vecinos (Ninio et al., 2011; Bartsch et al., 2009; Carpenter et al., 2013; Petterson et al., 2013; Muller, et al., 2014; Manock et al., 2009; Veggiani et al., 2011; Veggiani et al., 2012).

En países de Sudamérica (Brasil, Perú) se ha reportado especies del género *Culicoides* que son vectores del VLA (*C. insignis*, *C. pusillus* y *C. filarifer*) y virus del oropouche (*C. paraensis*). Estas especies también han sido encontradas en Ecuador, sin embargo no se han hecho estudios para saber si también sirven como vectores dentro del país, y tampoco se conoce si existen nuevas especies que podrían ser vectores. En consecuencia, es importante que los países estén preparados para posibles aparecimientos de enfermedades transmitidas por vectores. Para lograr esto, es importante conocer la diversidad de especies culicoides, su distribución geográfica, y la presencia de posibles vectores, con el fin de establecer zonas de riesgo potencial de brotes epidémicos.

En Ecuador y en Latinoamérica existen muy pocos estudios sobre los patrones de alimentación de los culicoides, lo cual es necesario para conocer y determinar ciertas características del ciclo de vida de estos insectos y así poder identificar los posibles reservorios de patógenos de importancia médica y veterinaria

El estudio de la distribución de especies del género *Culicoides* puede ayudar a conocer el rol biológico y epidemiológico de estos dípteros. Además sirve para conocer y actualizar el número de especies de culicoides presentes en diferentes zonas geográficas del Ecuador.

La identificación de las fuentes de alimento (sangre) de *Culicoides* en algunas zonas de la Estación de Biodiversidad Tiputini es de gran utilidad para conocer si las preferencias tróficas varían dependiendo del lugar de colección y de la presencia de hospedadores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Identificar a nivel molecular las preferencias tróficas del género *Culicoides* en la estación de Biodiversidad Tiputini.

3.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar hembras del género *Culicoides* con ingesta reciente de sangre en su abdomen
- Identificar los especímenes colectados a nivel de especie basado en criterios morfológicos
- Actualizar los registros de la fauna de culicoides de la Estación de Biodiversidad Tiputini

4. ÁREA DE ESTUDIO

Los especímenes fueron recolectados en la Estación de Biodiversidad Tiputini de la Universidad San Francisco de Quito, desde el 25 de octubre hasta el 30 de octubre del año 2013 (Figura 4).

La estación de Biodiversidad Tiputini (TBS 0°37'5"S, 76°10'19"W) se encuentra en la provincia de Orellana, Ecuador. Su altitud fluctúa entre los 190-270 metros sobre el nivel del mar. Tiene una humedad relativa mensual que varía alrededor del 90%. La temperatura mensual es de 24°C. Tiene dos épocas de lluvia: la primera de Abril-Julio y la segunda Septiembre-Diciembre. Su tipo de suelo es ácido y arcilloso (Cisneros, 2003).

La identificación de la especie del género *Culicoides* se realizó dentro del Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). La extracción de ADN y la amplificación del gen PNOC se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ.

5. MATERIALES

5.1 Colección de especímenes

- Trampas de luz tipo CDC (Centers for Disease Control)
- Baterías 6V
- Cargador de baterías
- Mallas entomológicas
- Frascos de colección

- Etanol al 70%
- GPS (GARMIN)

5.2 Separación de especímenes

- Cajas Petri
- Alcohol al 70%
- Pinzas entomológicas
- Estereomicroscopio LEICA
- Pipetas desechables
- Tubos eppendorf TM de 1.5 ml

5.3 Identificación de especies

- Placas portaobjetos
- Placas cubreobjetos circular
- Pinzas entomológicas
- Pipetas desechables
- Jeringas de 1ml y agujas
- Mechero Bunsen
- Alcohol al 70%
- Solución Marc André (hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%)
- Goma cloral (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábica 20% y Glicerina 13%)
- Microscopio de luz (LEICA EZ4, Wetzlar, Alemania)
- Cámara fotográfica LEICA

5.4 Extracción de ADN

- Solución CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8),
- Proteinasa K (Invitrogen)
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Etanol 70% y 100%
- Buffer TE0 (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA)
- Microcentrifugadora Eppendorf ®
- Vortex
- Baño de Arena

5.5 Amplificación de ADN

- ADN extraído de culicoides suspendido en buffer TE
- Buffer de PCR 5X PROMEGA
- $MgCl_2$ 25 mM PROMEGA
- dNTP's 2 mM PROMEGA
- Primer PNOC (50uM) Forward 5'-GCATCCTTGAGTGTGAAGAGAA-3'(Ninio et al., 2010)
- Primer PNOC (50uM) Reverse 5'-TGCCTCATAAACTCACTGAACC-3' (Ninio et al., 2010)
- Taq Polimerasa GoTaq PROMEGA
- Agua ultra pura para PCR GIBCO
- Termociclador BIORAD

5.6 Secuenciamiento

- Amplicones PNOC de culicoides enviados a Coulter Genomics, Inglaterra.

5.7 Análisis de secuencias

- Software libre MEGA6
- Base de datos online BLAST

6. MÉTODOS

6.1 Colección entomológica.

La colección se realizó durante 6 días (25-30 Octubre del 2013). Cada día, entre las 4 y 6 de la tarde, se colocó trampas tipo CDC de luz clara y trampas de luz ultravioleta (UV) en distintos puntos de la Estación de Biodiversidad Tiputini. Durante la etapa de colección se colocó un total de 47 trampas divididas en: 27 trampas CDC de luz clara y 20 trampas UV. Se colocó las trampas a alturas entre 1.70 y 2 metros de altura. Enseguida, se procedió a conectar las trampas a baterías de 6 V y se las dejó encendidas durante toda la noche. Luego de dejar lista la trampa, se tomó datos de las coordenadas geográficas con la ayuda de un GPS Garmin®. Al día siguiente, entre las 6 y 7 de la mañana, se procedió a retirar la trampa y su malla entomológica. Los especímenes capturados en la malla entomológica fueron colocados a -20°C para anestésarlos, y luego se los transfirió a un frasco con alcohol al 70%, y se registró la fecha, coordenadas y número de trampa de cada colección

Al terminar la semana de recolección, todos los frascos fueron transportados hacia el Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical de la Universidad San Francisco de Quito y se los almacenó en un congelador a -20°C .

6.2 Separación de Muestras

Se colocó el contenido de cada frasco en una caja petri. Con ayuda de un esteromicroscopio se procedió a separar los culicoides utilizando tres criterios morfológicos: 1) ojos grandes que inician en la cara anterior de la cabeza y cubren las caras laterales y llegan hasta la frente, 2) antenas con segmentos alargados y forma de cadena, y 3) alas membranosas con patrones geométricos de pigmentación específica (Borkent & Spinelli, 2007).

Luego se separó machos y hembras usando criterios morfológicos descritos por Borkent & Spinelli (2007). Adicionalmente se separó las hembras del género *Culicoides* con ingesta de sangres reciente, los cuales se los puede identificar por su abdomen abultado y su coloración roja (Ninio et al., 2011).

6.3 Montaje en placa de culicoides

Con una pipeta pasteur desechable se colocó cada espécimen en una lámina portaobjetos. Luego, bajo la luz de un estéreo microscopio y con la ayuda de agujas estériles, se separó la cabeza, las alas, y los 3 últimos segmentos del abdomen.

Se almacenó el tórax y el resto del abdomen de los culicoides a -20°C en un micro tubo de 1,5 ml para los estudios moleculares posteriores. Por otra parte, se situó la cabeza y la espermateca de los culicoides en un borde del portaobjetos, y se les adicionó una gota de solución Marc André (hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%) a la que se le flameó

durante 3 segundos para aclarar las estructuras. Luego, en una lámina portaobjetos nueva, se adicionó una gota de goma cloral (hidrato de cloral 30%, goma arábiga 20% y glicerina 13%) y con la ayuda de las agujas se acomodó las alas, la cabeza y la espermateca de los culicoides hasta que quedaron con la base del ala hacia el lado izquierdo; la cabeza con las antenas hacia abajo, la foseta hacia arriba; y la espermateca mirando arriba. Luego, con una pinza se tomó un cubreobjetos circular y con mucho cuidado se lo situó sobre la goma cloral evitando el ingreso de aire y la formación de burbujas.

Finalmente se rotuló las placas con la información de lugar, fecha, coordenadas y se conservó en un lugar seco dentro de una caja de placas entomológicas.

6.4 Identificación morfológica de especies

Para el determinar la especie de cada ejemplar se observó los patrones geométricos de manchas de las alas, el tamaño y cantidad de espermateca, y la morfología de la cabeza de acuerdo con los criterios taxonómicos descritos por Wirth (1988) y Spinelli et al., (2005).

Con el uso de un microscopio y una cámara de marca LEICA con un aumento de 20X se tomó fotografías de las alas, cabeza y espermateca. El registro fotográfico de las diferentes partes de culicoides fue transferido a una computadora para su posterior análisis. Adicionalmente, la identificación de especies fue confirmada por dos expertos en identificación de especies de *Culicoides*: Gustavo Spinelli y Denis Augot.

6.5 Análisis Molecular

6.5.1 Extracción de ADN

Se colocó 700 μ l de solución CTAB en el microtubo de 1,5 ml que contenía el tórax y parte del abdomen del insecto. Luego se procedió a triturar esta mezcla con la ayuda de un pistilo estéril durante 5 minutos. Seguidamente se adicionó 20 μ l de proteinasa K, se homogenizó la mezcla en un vórtex durante 30 segundos y después se incubó el tubo a 65°C en un baño de arena con agitación manual cada 30 minutos. Posteriormente se enfrió las muestras a temperatura ambiente, se agregó 700 μ l de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó los tubos por inversión hasta observar la formación de una emulsión la cual se sometió a centrifugación por 5 minutos a 12000 rpm. Con una pipeta, sin tocar la interfase, se tomó 500 μ l de la fase acuosa y se la transfirió a un tubo nuevo de 1.5ml. Se agregó 1000 μ l de etanol al 100%, se agitó por inversión durante 3 minutos y el tubo con la mezcla fue almacenado en un congelador a -20°C durante una noche.

El día siguiente se centrifugó las muestras a 13200 rpm durante 11 minutos. Se observó el pellet de ADN y se descartó el sobrenadante. En seguida se lavó el pellet con 1000 μ l de etanol al 70% y se agitó por inversión. Se centrifugó nuevamente a 13200 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se dejó secar la muestra durante 2 horas. Finalmente se resuspendió la muestra en 50 μ l de buffer TE y la muestra fue almacenada a -20°C.

6.5.2 Amplificación de ADN

De la extracción de ADN de sangre encontrada en el abdomen de los culicoides se amplificó el gen de la prepronociceptina (PNOC) el cual tiene un tamaño de 333 pares de bases. Se preparó

reacciones de 30ul; cada reacción de 30 µl contenía: 14.67µl de agua de PCR, 6µl de buffer, 3.6µl de MgCl₂, 2.1µl de dNTP's, 0.24µl de primer PNOC forward, 0.24 de primer PNOC reverse, 0.15µl de Taq polimerasa, y finalmente se añadieron 3µl de la muestra de ADN de culicoides (Anexo 1).

Se colocó 5µl de los amplicones en un gel de agarosa al 1.5% y con bromuro de etidio (0.1%), e inmediatamente se realizó una electroforesis con un voltaje de 88 voltios durante 45 minutos. Posteriormente se tomo una fotografía al gel para confirmar la presencia de la banda de 333 pares de bases.

6.5.3 Secuenciamiento

Los amplicones que mostraron una sola banda intensa en el gel de agarosa fueron enviados para secuenciar a la empresa Coulter Genomics, Inglaterra. La secuenciación se la realizó en ambos sentidos.

Para el análisis de las secuencias se utilizó el software libre MEGA6, y posteriormente se comparó la secuencia obtenida con la base de datos en línea BLAST.

1. RESULTADOS

7.1 Colección Entomológica

De un total de 47 trampas, se colectó 3 853 especímenes (machos y hembras) del género *Culicoides*. De los cuales 3 150 individuos (81.8%) fueron hembras y 703 individuos (18.2%) fueron machos (Figura 5). Del total de hembras colectadas, 2 953 hembras (93.7%) no

presentaron ingesta de sangre, mientras que 197 hembras (6.3%) si tuvieron ingesta de sangre reciente (Figura 6).

De los 3853 individuos, se identificó 197 hembras del género *Culicoides* con ingesta de sangre reciente pertenecientes a 34 especies y 7 subgéneros. Las especies con mayor número de individuos capturados con ingesta de sangre reciente fueron: *C. dasyophrus* (n=79), *C. guttatus* (n=32) y *C. leopoldoi* (n=22) (Tabla 1).

Hubo un promedio de tres especies de culicoides con ingesta de sangre por cada trampa. Sin embargo, cinco fueron las trampas que tuvieron un número de especies mayor al promedio. La trampa número 1 tuvo 12 especies, la trampa 24 tuvo 10 especies, la trampa 30 tuvo 5 especies, la trampa 32 tuvo 7 especies y la trampa 34 tuvo 10 especies. En la trampa número 44 se evidenció la presencia de una sola especie (*C. dasyophrus*), no obstante es en la que se recuperó la mayor cantidad de individuos con ingesta de sangre (n=63) (Figura 7).

Se extrajo ADN de los 197 especímenes con ingesta de sangre y se utilizó tres métodos de extracción. Se extrajo 64 muestras con CTAB y acetato de sodio, 88 muestras con CTAB sin acetato de sodio y finalmente 44 muestras con kit de extracción de ADN Quiagen®.

De las 197 muestras extraídas, 43 fueron las muestras que amplificaron positivamente el gen PNOG (Figura 8), las cuales pertenecen a 11 especies dentro de 4 subgéneros. El subgénero “No definido” fue el más frecuente con 21 individuos (48,8%), luego se sitúa el subgénero *Hoffmania* con 18 individuos (41,9%), seguido del subgénero *Haematotidium* con 3 individuos (7%) y finalmente el subgénero *Anilomyia* con 1 individuo (2,3%).

Se identificó 6 grupos de especies: grupo *dasyophrus* (45%), grupo *guttatus* (42,5%), grupo *covegarciai* (2,5%), grupo *hylas* (2,5%) grupo *fluvialis* (2,5%); grupo *reticulatus* (5%) (Tabla 2).

Los 43 culicoides PNOC positivos pertenecientes a 11 especies tuvieron la siguiente distribución en las trampas de colección: *C. batesi*, *C. filarifer*, *C. hylas*, *C. metagonatus* *C. dasyophrus*, *C. leopoldoi*, *C. reticulatus* y *C. pifanoi* estuvieron presentes en una sola trampa. Asimismo, *C. glabrior* y *C. fusipalpis* estuvieron presentes en dos trampas. Finalmente, *C. guttatus* estuvo presente en 4 trampas (Tabla 3).

7.2 Análisis Molecular de las Fuentes de Alimentación

Se secuenció las 43 muestras que amplificaron el gen PNOC, luego de lo cual se indentificó 5 fuentes de alimento (sangre): *Ateles belzebut* (mono araña), *Choloepus didactylus* (oso perezoso), *Homo sapiens* (humano), *Lagothrix poeppigii* (mono chorongo) y *Capra hircus* (cabra).

Las fuentes de alimentación predominantes fueron *Ateles belzebut* (n=20) y *Lagothrix poeppigii* (n=17). En menor cantidad se alimentaron de *Homo sapiens* (n=1), *Choloepus didactylus* (n=4) y *Capra hircus* (n=1) (Tabla 3).

El mono araña sirvió de fuente de alimento para: *C. dasyophrus*, *C. guttatus* y *C. reticulatus*. Una sola especie (*C. filarifer*) se alimentó de humano. El mono chorongo fue la fuente de sangre para *C. batesi*, *C. fusipalpis*, *C. glabrior*, *C. guttatus*, *C. metagonatus* y *C. pifanoi*. El oso peresozo (*Choloepus didactylus*) alimentó a *C. glabrior*, *C. hylas* y *C. Leopoldoi*. Finalmente, una cabra (*Capra hircus*) fue la fuente de sangre para *C.guttatus* (Tabla 3 y 4).

8. DISCUSIÓN

El porcentaje de hembras culicoides colectadas en el presente estudio (81,2%) contrasta con otros estudios realizados en Europa, Asia y África, en los que se ha encontrado que el porcentaje de hembras culicoides capturadas es superior al 90%, algunas veces llegando al 99% del total de individuos colectados (Deniz, 2010; Kim et al., 2012; Archana et al., 2014; Martínez de la Puente et al., 2012; Ayllón et al., 2014; Mellor et al., 1984). En Ecuador, dos estudios encontraron un 77% y 62% de hembras culicoides recolectadas en las provincias de: Pichincha, Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Bolívar, Manabí, Imbabura, Sucumbíos y Orellana (Gualapuro, 2013; Torres, 2014). Estas variaciones en los porcentajes de machos y hembras capturados pueden deberse a que los culicoides exhiben diferentes comportamientos dependiendo del medio ambiente en que viven, época del año en que se realizan colectas y por lo tanto cambian sus hábitos de descanso, ovoposición, dispersión y búsqueda de hospedadores. Estas etapas afectan la capacidad de muestrear la población (Birley & Boorman, 1982; Purse et al., 2012; Kim et al., 2014; Viennet et al., 2011).

Es importante señalar que si durante una colecta se obtiene una gran cantidad de hembras, no necesariamente significa que muchas de ellas tengan ingesta de sangre. Esto se debe a que las hembras del género *Culicoides* descansan luego de ingerir sangre, y por lo tanto hay pocas posibilidades de que se acerquen hacia las trampas de luz. Generalmente, las hembras que más se acercan a las trampas de luz son las que todavía no se han alimentado y están en búsqueda de una fuente de sangre. Adicionalmente, el tiempo en que se realice la colecta influye mucho en la captura de hembras con ingesta reciente, ya que se ha encontrado que los culicoides pueden pasar hasta 92 días sin ingerir sangre (Giffredo et al., 2004). Por lo tanto es necesario

realizar colecciones con mayor frecuencia para aumentar la probabilidad colectar hembras con ingesta de sangre. También es importante señalar que las hembras que se capturan con ingesta de sangre pueden presentar diferentes grados de digestión de sangre. Las hembras con ingesta reciente de sangre, presentan una coloración roja intensa en el abdomen, mientras que las ingestas pasadas tienen una coloración café. Adicionalmente, se ha determinado que en lugares calientes y con alta humedad, la digestión es más rápida lo cual dificulta la colecta de hembras con una calidad de sangre que permita la identificación de la fuente de alimentación (Swami & Srivasta, 2012; Farjana & Tuno, 2012).

El comportamiento hematófago de las hembras del género *Culicoides* es determinante en la etapa de colección de especímenes, ya que en lugares donde existen muchos animales que sirvan como fuente de sangre, hay más probabilidad de encontrar una mayor cantidad de hembras (Afridi & Puri, 1940; Bhatt et al., 2008). Esto se debe a que las hembras necesitan alimentarse de sangre para que sus huevos puedan madurar. Las hembras del género *Culicoides* se alimentan de sangre, dos hasta tres veces durante su vida (Mullen & Durden, 2002). También se ha encontrado que el ambiente en el que se desarrollan los culicoides ejerce una importante influencia en los patrones de alimentación (Afridi & Puri, 1940; Bhatt et al., 2008).

En un estudio realizado en Ecuador por Torres (2014) se encontró un 7.4% de hembras con ingesta reciente de sangre, lo cuál es similar al 6.3% de hembras con ingesta de sangre que se halló en el presente estudio. Por otro lado también hay estudios con porcentajes de hembras con ingesta de sangre más bajos que van desde 1,9% hasta 3,18% (Garros et al ., 2011;

Bartsch et al., 2009; Lassen et al., 2010; Walker & Davie, 1971; Lassen et al., 2012; Meiswinkel et al., 2004; Mellor et al., 1984).

El subgénero “No definido” fue el que tuvo la mayor cantidad de hembras *Culicoides* con ingesta reciente de sangre (50%). Estos resultados contrastan a los estudios presentados por Gualapuro (2013) y Torres (2014) cuyos resultados determinaron que el subgénero *Hoffmania* fue el predominante.

Dentro de los 197 especímenes con ingesta de sangre reciente se identificó 34 especies. La diversidad encontrada en el Tiputini contrasta con la que se ha hallado en otras regiones del mundo. En Korea, luego de una colecta de 16.000 individuos de *Culicoides*, se identificó solamente 7 especies. (Oem et al., 2012). En Europa central, se identificó 16 especies dentro de 1959 individuos (Lacková et al., 2013). En Alaska se han encontrado 6 especies de culicoides (Wirth, 1951). En la península escandinava se han identificado 15 especies (Pettersson et al., 2013) mientras que en Grecia se han identificado 39 especies de culicoides (Patakakis et al., 2009). Factores como: la temperatura cálida, humedad alta, y fuentes de alimento presentes en la zona del Tiputini podrían ser factores que contribuyan al desarrollo y crecimiento de los culicoides (Boorman, 1993; Walker, 1977; Larsen et al., 2012; Oem et al., 2012; Meiswinkel., 2004; Veggiani et al., 2011; Breidenbaugh et al., 2009; Becker et al., 2012; Rawlings et al., 1997; Hoch et al., 1990).

C. dasyophrus fue la especie que tuvo más ejemplares con ingesta de sangre (n=79) y estuvo presente en 7 trampas. Sin embargo, en una sola de estas trampas se encontró 63 individuos. Esta trampa fue colocada en un saladero el cual es rico en sales y minerales, por lo que diferentes especies de animales como guacamayos, pavas, venados, tapires, pecaríes, monos

entre otros, van a alimentarse (Jaramillo, 2010). La disponibilidad de gran cantidad de fuentes de alimento (sangre) podría explicar porque esta trampa fue la que tuvo la mayor cantidad de culicoides con ingesta de sangre. Además, *C. dasyophrus* fue la única especie con ingesta de sangre en la trampa del saladero, lo cual no significa que no existan otras especies de culicoides que se alimenten de los animales del saladero, sino que la diversidad de culicoides puede variar dependiendo de la época en que se realice la colección. Por ejemplo, un estudio en la Península Ibérica determinó que *C. imicola* tiene mayor abundancia que otras especies de culicoides al final del verano e inicio de otoño (Rawlings et al., 1997). En Korea, se determinó que en las épocas de Junio a Agosto, las trampas contenían una mayor cantidad de especies, mientras de septiembre a octubre el porcentaje de especies del género *Culicoides* era menor (Kim et al., 2012). Además, puede ser que *C. dasyophrus* tenga cierta preferencia por vivir en los saladeros y sus alrededores porque hay más alimento, sitios de ovoposición (lodazales, charcos de agua), sitios de descanso como hojas de plantas y troncos de árboles. Existen patrones similares de distribución, donde una sola especie es la predominante, por ejemplo en Sudáfrica se observó que *C. imicola* representó el 98% de los culicoides colectados (Venter et al, 2012). Estudios realizados en Argentina determinaron que la distribución de los culicoides varía dependiendo del lugar en que se realice la colecta; por ejemplo en la localidad de Agua blancas predominó *C. paraensis*, en El Oculito prevaleció *C.lahillei* y en San Ramón *C. debilipalpis* (Veggiani et al., 2012).

Asimismo se debe tomar en cuenta el rango de atracción de los culicoides hacia las trampas de luz. En un estudio se ha encontrado que para culicoides, el rango de atracción es de 15.25 metros en espacio abierto y se muestra que algunas especies no están tan atraídas a las luz

como otras (Kirkeby et al., 2013). Inclusive se ha visto que el rango de atracción de la trampa puede ser muy corto (2-4 metros) (Becker et al., 2013).

C. guttatus fue la segunda especie que tuvo más ejemplares (n=30), lo que representa el 15,2% del total de hembras con ingesta de sangre reciente. Un estudio en Estados Unidos observó que esta especie tiene una gran versatilidad para adaptarse a diferentes ambientes. (Beck, 1952). En Ecuador, un estudio realizado en 2014 en 5 diferentes provincias, también encontró a *C. guttatus* como una especie con alto número de individuos (Torres, 2014).

Para el análisis molecular de las fuentes de alimentación (sangre) se extrajo ADN de 197 especímenes con ingesta de sangre reciente. El 21,8% de culicoides (n=43) amplificó el gen PNOC, lo que representa un porcentaje inferior a otros estudios similares hechos en dípteros en los cuales se reportan porcentajes de amplificación superiores al 70% (García, 2011; Molaie, 2006; Alarcón et al., 2012; Kirchgatter et al., 2014). En el primer estudio sobre fuentes de alimentación hecho en Ecuador, se observó una amplificación del 72.8% (Torres, 2014); sin embargo, el número de especímenes capturados con ingesta de sangre reciente fue 59, resultado que contrasta con los 196 ejemplares con ingesta de sangre que se obtuvieron en este estudio.

La clasificación del grado de digestión de la sangre puede ser un factor que influyó para el bajo porcentaje de amplificación del gen PNOC. Esta clasificación depende de la observación del color de la sangre dentro del abdomen de los culicoides (Ninio et al., 2011). La sangre de color roja indica un grado de digestión bajo mientras que la sangre de color café sugiere un grado de digestión alto (Ninio et al., 2011; Kristein & Gray, 1996; Boakye et al., 1999; Ngo & Kramer, 2003; Kent & Norris, 2005). En las especies del género *Culicoides* es difícil

distinguir la coloración roja (clara) de la sangre debido a que su abdomen tiene una coloración café oscura, por lo tanto se pudieron haber seleccionado culicoides cuya sangre estaba en un proceso de digestión avanzado, las cuáles no amplifican el gen PNOC.

El método de extracción de ADN también pudo haber tenido efecto en la amplificación del gen PNOC. De las 44 muestras extraída con el kit Quiagen®, 11 fueron PNOC positivas. Se debe tomar en cuenta que cada kit de extracción puede no ser apropiado para diferentes tipos de muestras. Además la extracción de ADN de buena calidad depende de la naturaleza de las muestras (Demeke & Jenkins, 2010).

La extracción de ADN con el método de CTAB es una técnica bastante utilizada. Dentro de este método existen variaciones en la concentración y volumen de reactivos que se utilizan dependiendo del tipo de muestra a procesar. En el presente estudio, ninguna de las muestras extraídas con acetato de sodio amplificó el gen PNOC, mientras que 31 muestras extraídas sin acetato de sodio amplificaron positivamente el gen PNOC. Si bien en ciertas muestras (plantas) el acetato de sodio funciona bien para precipitar ADN, en otras muestras (parásitos) el acetato de sodio ha sido identificado como un inhibidor de PCR (Menghi et al., 2006; Demeke & Jenkins, 2010).

Once fueron las especies de culicoides que amplificaron el gen PNOC de las cuales 2 especies (*C. dasyophrus* y *C. guttatus*) representan el 60.05%. Esto sugiere cierta relación entre amplificación y cantidad de especímenes. Si se desea saber los patrones de alimentación de una especie del género culicoides en específico, por ejemplo *C. paraensis* el cual es de interés médico, es necesario coleccionar la mayor cantidad de hembras con ingesta de sangre, ya que esto aumenta la probabilidad de amplificación del gen PNOC.

El 77,7% (n=153) de muestras de ADN no amplificó el gen PNOC, lo que sugiere que estas muestras de sangre no eran de buena calidad debido a un proceso de digestión (Calvo et al., 2012). La cantidad de sangre que ingieren los culicoides (0.01 a 0.06µl) también influye en la rapidez con que se digiere la sangre (Venter et al., 2005). En otros insectos se ha observado una ingesta de sangre de 1µl a 37 µl (Haouas et al., 2007; Torr & Hargrove, 1998)

Una de las especies que no pudo amplificar el gen PNOC es *C. paraensis*. Esta especie es de importancia médica ya que ha sido identificado como el vector del virus de Oropouche (OROV) en países como: Brasil, Perú, Panamá y Trinidad y Tobago donde se han observado casos de la fiebre de Oropouche, mientras que en Ecuador en el año 2009 se detectó anticuerpos para OROV en un paciente de la provincia de Pastaza (Borket & Spinelli, 2007; Manock et al., 2009).

En el presente estudio se encontraron las siguientes fuentes de alimentación (sangre): *Ateles belzebuth*, *Lagothrix poeppigii*, *Choloepus didactylus*, *Homo sapiens* y *Capra hircus*. De los cuales: *Choloepus didactylus* y *Homo sapiens* han sido ya reportados como fuente de alimentación de culicoides presentes en la costa y sierra ecuatoriana (Torres, 2014). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el gen PNOC sirve sólo para identificar vertebrados, por lo que no es posible detectar otras fuentes de alimento como artrópodos y demás invertebrados (Russell., 2013; Service, 2012; Torres, 2014).

Ateles belzebuth (mono araña) fue la principal fuente de alimentación. Es el primer reporte de este vertebrado como fuente de alimentación de los culicoides. Las especies del género *Culicoides* que se alimentaron de *Ateles belzebuth* fueron *C. dasyophrus* (n=18), *C. guttatus*(n=1), *C. reticulatus*(n=1). De estos, *C. dasyophrus* y *C. reticulatus* se alimentaron

exclusivamente del mono araña. Se puede observar que hubo una preferencia absoluta de *C. dasyophrus* y *C. reticulatus* por el mono araña, mientras que *C. guttatus* se alimentó adicionalmente de mono chorongo y cabra. Se han observado patrones de alimentación similares en *C. nipponensis* el cual tiene una preferencia por el ganado vacuno (Kim et al, 2012).

Lagothrix poeppigii (mono chorongo) fue la segunda fuente de alimentación (sangre). También constituye el primer reporte del mono chorongo como fuente de alimentación de los culicoides. Las especies que se alimentaron de *Lagothrix poeppigii* fueron *C. guttatus* (n=15), *C. efferus* (n=1), *C. glabrior* (n=1). De estos, *C. efferus* se alimentó exclusivamente de mono chorongo.

Choloepus didactylus (oso perezoso) fue la fuente de alimentación para *C. glabrior*, *C. hylas*, *C. leopoldoi*. De éstos, *C. Hylas* y *C. leopoldoi* se alimentaron exclusivamente de este mamífero, mientras que *C. glabrior* se alimentó de oso perezoso y mono chorongo. En el estudio de Torres (2014) se reportó a *C. hylas* y *C. tetrahyris* como especies que se alimentan de osos perezosos, a este dato se suma *C. glabrior* y *C. leopoldoi* encontradas en el presente estudio. Los osos perezosos son conocidos reservorios de parásitos como de *Taeniarhynchus* sp. (Tenias) y *Strongyloides* sp. (Nemátodos) (Rimbaud et al., 2005).

Se reporta por primera vez a *C. filarifer* como antropofílico. *Homo sapiens* sirvió de fuente de alimentación exclusiva para *C. filarifer*. Se descarta una contaminación con ADN de operador ya que el espécimen fue parte de un lote de extracción 10 muestras, de las cuales 3 fueron positivas para mono chorongo y 6 para mono araña. En caso de contaminación se hubiera

esperado que más muestras fueran positivas para *Homo sapiens*. Adicionalmente se tomó todas las precauciones de bioseguridad para evitar la contaminación.

Adicionalmente, se reporta por primera vez a *Capra hircus* como fuente de sangre para *C. guttatus*. Este hallazgo no concuerda con la descripción de especies presentes en la zona del Tiputini. Se plantea la posibilidad de que la secuencia obtenida de la muestra de sangre pertenezca a alguna especie cercana a la cabra, posiblemente un ungulado (venado). Debido a que la secuencia de este ungulado no está registrada en la base de datos BLAST, el software proyecta una homología con la especie más cercana y cuya secuencia sí está en la base de datos, que en este caso es la cabra.

Dentro de la distribución de los culicoides PNOC positivos es interesante señalar que 8 especies (*C. batesi*, *C. filarifer*, *C. hylas*, *C. metagonatus*, *C. dasyophrus*, *C. leopoldoi*, *C. reticulatus*, *C. pifanoi*), estuvieron distribuidas en 8 diferentes trampas (1 especie por trampa); *C. fusipalpis* al igual que *C. glabrior* estuvieron presentes en 2 trampas. Esto sugiere que estas especies no están ampliamente distribuidas en la zonas del Tiputini donde se realizó las colectas, y que tienen cierta preferencia para vivir en esos lugares; sin embargo una sola especie (*C. guttatus*) estuvo presente en 5 trampas lo cual apunta a que tienen una mayor distribución en el Tiputini (Tabla 2). Ahora bien si se analiza la cantidad de especies por trampa, se puede observar que la trampa número 1 tuvo la presencia de 4 especies mientras que las otras tuvieron la presencia de 1-2 especies. Esto puede deberse a que estas especies comparten una preferencia por ese hábitat (Tabla 2). Adicionalmente, es interesante observar que las especies de la trampa 1 tuvieron tres fuentes de alimento, mientras que las especies de las trampas 11, 13, 16, 28, 30, 32, 34, 42, 43, 44 tuvieron solamente una fuente de alimento

(Tabla 3). Esto puede deberse a la disponibilidad de fuentes de sangre que exista en la zona (Swami & Srivasta, 2012; Gavaudan et al, 2013; Vijayakumar ., 2014; Jahangir ., 2008; Dhiman et al., 2014; Ninio et al., 2011; Torres, 2014).

Las especies de culicoides (*C. glabrior* y *C. guttatus*) que se alimentaron de 2 ó 3 fuentes pueden ser candidatos para estudios posteriores en los que se determine si son generalistas. Estos tipos de especies son de especial interés ya que son las que potencialmente pueden ser vectores de enfermedades como el virus de la lengua azul, y virus de Oropouche del cual se tuvo el primer reporte en el año 2009 en la provincia de Pastaza (Manock et al, 2009; Torres, 2014; Alarcón et al., 2012).

La base química por la cual los culicoides están más atraídos a una especie en lugar de otras todavía es desconocida. Aparentemente, los olores influyen en esta selección. Se sabe que los olores de muchos vertebrados son conocidos por proveer información sobre la identidad del individuo (sexo, estado reproductivo, y estado de salud a los miembros de la misma especie. Esto puede influenciar la selección de hospedadores. En otros dípteros como *Anopheles* se ha observado que prefieren alimentarse de adultos que de niños (Logan et al., 2010).

9. CONCLUSIONES

El porcentaje de hembras culicoides con ingesta de sangre fue de 6.3%. Se identificó 34 especies distribuidas en 6 subgéneros. Los subgéneros “No definido” y *Hoffmania* fueron los más frecuentes. Las especies con mayor número de individuos con ingesta de sangra fueron: *C. dasyophrus* y *C. guttatus*.

Se identificó a *Ateles belzebuth*, *Lagothrix poeppigii*, *Choloepus didactylus*, *Homo sapiens*, y *Capra hircus* como la fuente de alimentación de la fauna de culicoides recolectados en algunas zonas de la Estación de Biodiversidad Tiputini de la Universidad San Francisco de Quito.

Se reporta por primera vez a *Ateles belzebuth* y *Lagothrix poeppigii* como preferencias tróficas del género *Culicoides*. También que *C. glabrior* y *C. Leopoldoi*, se alimentan de *Choloepus didactylus*; *C. filarifer* como especie antropofílica; y que un ungulado (probablemente un venado) es la fuente de sangre para *C. guttatus*.

10. RECOMENDACIONES

Realizar colectas en diferentes épocas del año para tener mayor probabilidad de atrapar culicoides con ingesta de sangre reciente y conocer la diversidad de la fauna del género *Culicoides* de la Estación de Biodiversidad Tiputini.

Determinar las preferencias de tróficas de especies de interés médico, *C. paraensis* para establecer el riesgo en la transmisión del virus de Oropuche.

Determinar la factibilidad de hacer colectas por aspiración para capturar hembras con ingesta de sangre en sitios de reposo.

Realizar la separación de especímenes con ingesta de sangre *in situ* (trampas shanon) a diferentes horas y conservar a bajas temperaturas para prevenir la degradación del ADN. Además, conocer el ritmo nictameral de diferentes especies de culicoides.

Utilizar trampas de CO₂ ó trampas con cebo (animal) para atraer mayor número de especies.

Utilizar marcadores de invertebrados para determinar las fuentes de alimentación de las muestras negativa

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abu, E., Hilali, M. A., Al-afaleq, A. I., Mellor, P. S., Boorman, J., Al-atiya, S., y otros. (2002). Seasonal abundance of four *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) at AL-Ahsa oasis, Eastern Province, Saudi Arabia. *Journal of Veterinary Research* , 115-122.
- Acevedo, P., Ruiz-Fonss, F., Estrada, R., Márquez, A. L., Miranda, M. A., Gortázar, C., y otros. (2010). A broad Assessment of Factors Determining *Culicoides imicola* Abundance: Modelling the Present and Forecasting Its Future in Climate Change Scenarios. *PloS ONE* .
- Afridi, M. K., & Puri, I. M. (1940). Studies on the Behavior of Adult *Anopheles culicifacies*. *Journal of the Malaria Institute of India* , 1-22.
- Alarcón, D., Havelka, P., Schaefer, H., & Segelbacher, G. (2012). Bloodmeal Analysis Reveals Avian Plasmodium INfections and Broad Host Preferences of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Vectors. *PloS ONE* .
- Archana, M., D'Souza, P. E., Prasad, C. R., & Byregowda, S. M. (2014). Seasonal prevalence of different species of *Culicoides* in Bangalore rural and urban districts of South India. *Veterinary World* , 517-521.
- Ayllón, T., Nijhof, A. M., Weiher, W., Bauer, B., Allène, X., & Clausen, P. H. (2014). Feeding behaviour of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle and sheep in northeast Germany. *Parasites & Vectors* , 1-9.
- Bartsch, S., Bauer, B., Wiemann, A., Clause, P. H., & Steuber, S. (2009). Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulcaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research* , 373-380.
- Basseri, H., Yosafi, S., & Moosakazemi, S. (2005). Blood Preferences of Malaria Vectors in Tehran. *Proceedings of fifth International Conference on Urban Pests* , 275-279.
- Beck, E. (1952). Notes on the Distribution of *Culicoides* in Florida (Diptera: Ceratopogonidae). *Division of Entomology* .
- Beckenbach, A., & Borkent, A. (2003). Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 21-35.
- Becker, E., Venter, G. J., Labuschagne, K., Greyling, T., & Van Hamburg, H. (2013). The effect of anthropogenic activity on the occurrence of *Culicoides* species in the South-Western Khomas Region, Namibia. *Veterinaria Italiana* , 277-284.

- Becker, E., Venter, G. J., Labuschange, K., Greyling, T., & Van Hamburg, H. (2012). Occurrence of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in the Khomas region of Namibia during the winter months. *Veterinaria Italiana* , 45-54.
- Bellis, G. A., Melville, L. F., Hunt, N. T., & Hearnden, M. N. (2004). Temporal Activity of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle near Darwin, Northern Territory, Australia. *Veterinaria Italiana* , 324-328.
- Benoit, J. B., Lopez-Martinez, G., Patrick, K. R., Phillips, Z. P., Krause, T. B., & Denlinger, D. L. (2011). Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 8026-8029.
- Bhatt, R. M., Srivastava, H. C., & Yadav, R. S. (2008). Dynamics of *Anopheles culicifacies* transmitted malaria in the absence of effective zooprophylaxis in riverine settlement in Gujrat, India. *Current Science* , 82-87.
- Birley, M. H., & Boorman, J. P. (1982). Estimating the survival and Biting Rates of Haematophagus Insects, with Particular Reference to the *Culicoides obsoletus* Group (Diptera, Ceratopogonidae) in Southern England. *Journal of Animal Ecology* , 135-148.
- Blackwell, A. (2004). A morphological investigation of *Culicoides* spp. biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the Caribbean. *Journal of Vector Ecology* , 51-61.
- Boakye, D. A., Tang, J., Truc, P., Merriweather, A., & Unnasch, T. R. (1999). Identification of bloodmeals in haematophagus Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Medical and Veterinary Entomology* , 282-287.
- Boorman, J. (1993). *Medical Insects and Arachnids*. England: Chapman & Hall.
- Borkent, A. (2012). The subgeneric Classification of Species of *Culicoides* - thoughts and a warning.
- Borket, A., & Spinelli, G. R. (2007). *Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta)*. Sofia, Bulgaria: Pensoft.
- Breidenbaugh, M. S., Clark, J. W., Brodeur, R. M., & Szalay, F. (2009). Seasonal and diel patterns of biting midges (Ceratopogonidae) and mosquitoes (Culicidae) on the Parris Island Marine Corps Recruit Depot. *Journal of Vector Ecology* , 129-140.
- Calvo, J. H., Berzal, B., Calvete, C., Miranda, M. A., Estrada, R., & Lucientes, J. (2012). Host feeding patterns of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) within the Picos de Europa National Park in northern Spain. *Bulletin of Entomological Research* , 692-697.
- Carpenter, S., Groschup, M. H., Garros, C., Felipe-Bauer, M. L., & Purse, B. V. (2013). *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Research* , 102-113.

- Cisneros, D. (2003). *Herpetofauna de la Estación de Biodiversidad Tiputini, Amazonía Ecuatoriana. Ecología de una comunidad taxonómicamente diversa, con comentarios sobre metodologías de inventario*. Quito.
- Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1977-1990.
- Deniz, A., Oncel, T., & Patakakis, M. J. (2010). Species Composition of Culicoides Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in Thrace Region of Turkey. *Kafkas University*, 1057-1060.
- Dhiman, S., Rabha, B., Goswami, D., Das, N. G., Baruah, I., Bhola, R. K., y otros. (2014). Insecticide resistance and human blood meal preference of anopheles annularis in Asom Meghalaya border area, northeast india. *Journal of Vector Borne Diseases*, 133-136.
- Drotman, P. (2014). Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*.
- Farjana, T., & Tuno, N. (2012). Effect of body size on multiple blood feeding and egg retention of Aedes aegypti (L.) and Aedes albopictus (Skuse) (Diptera:Culicidae). *Medical Entomology and Zoology*, 123-131.
- García, A., McCarter, P., & Baylis, M. (2011). The Influence of Host number on attraction of biting midges, Culicoides spp., to light traps. *Medical and Veterinary Entomology*.
- Garros, C., Gardes, L., Allene, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., y otros. (2011). Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in Culicoides (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orboviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 1103-1110.
- Gavaudan, S., Duranti, A., Barchiesi, F., Ruschioni, S., Antognini, E., Calandri, E., y otros. (2013). Sasonal monitoring of Aedes albopictus: practical applications and outcomes. *Veterinaria Italiana*, 109-116.
- Giffredo, M., Romeo, G., Monaco, F., Di Gennaro, A., & Savini, G. (2004). Laboratory survival and blood feeding response of wild-caught Culicoides obsoletus Complex (Diptera:Ceratopogonidae) through natural and artificial membranes. *Veterinaria Italiana*, 282-285.
- Gualapuro, M. (2013). *Contribución al estudio de la fauna de Culicoides (Díptera: Ceratopogonidae) en la zona norte del Ecuador*. Tesis de pregrado de la carrera de Biotecnología - Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J.-P., Babba, H., & Ravel, C. (2007). Development of a Molecular Tool for the Identification of Leishmania Reservoir Hosts by Blood Meal

Analysis in the Insect Vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 1054-1059.

Hoch, A. L., Roberts, D. R., & Pinheiro, F. P. (1990). Host-seeking behavior and seasonal abundance of *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association* , 110-114.

Jahangir, K., Lee, C., & Zairi, J. (2008). Effects of sugar and animal blood availability on attraction of *Aedes (stegomyia)* spp. to Humans. *Proceedings of the sixth International Conference on Urban Pests*. OOK-Press.

Jaramillo, G. (2010). *Los Saladeros como suplementos de sodio para los monos araña (Ateles Beltzebuth) en la Estación de Biodiversidad Tiputini, en la Amazonia ecuatoriana*.

Kent, R. J., & Norris, D. E. (2005). Identification of Mammalian Blood Meals in Mosquitoes by a Multiplexed Polymerase Chain Reaction Targeting Cytochrome B. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 336-342.

Kim, H. C., Bellis, G. A., Kim, M.-S., Chong, S.-T., Lee, D.-K., Park, J.-Y., y otros. (2012). Seasonal Abundance of Biting Midges, *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae), Collected at Cowsheds in the Southern Part of the Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology* , 127-131.

Kim, H. C., Bellis, G. A., Kim, M.-S., Klein, T. A., Chong, S.-T., & Park, J.-Y. (2014). Seasonal Abundance of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Collected by mosquito Magnet in Northern Gyeonggi-do (Province), Korea. *Korean Journal of Parasitology* , 57-62.

Kirchgatter, K., Tubaki, R. M., Malafronte, R., Alves, I., Lima, G., Guimaraes, L., y otros. (2014). *Anopheles (kertszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) in peridomiliary area during asymptomatic malaria transmission in the atlantic forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. *revista do instituto de medicina tropical de sao paulo* , 403-409.

Kirkeby, C., Græsbøll, K., Stockmarr, A., Christiansen, L. E., & Bødker, R. (2013). The range of attraction for light traps catching *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasites & Vectors* , 1-11.

Kristein, F., & Gray, J. S. (1996). A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Applied Environmental Microbiology* , 4060-4065.

- Lacková, Z., Bires, J., Smarzik, M., Soltèsová, H., & Hisira, V. (2013). Monitoring of *Febris Catahalis ovium* in the dairy Cattle Farm. *XIII Middle European Buiatric's Congress*, (págs. 405-4012). Belgrado, Republica Checa.
- Larsen, T. H., Escobar, F., & Armbrrecht, I. (2012). Insectos de los Andes Tropicales: Patrones de Diversidad, Procesos y Cambio global. 265-286.
- Lassen, S. B., Nielsen, S. A., & Kristensen, M. (2012). Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera:Ceratopogonidae:Culicoides Latreille) in Denmark. *Parasites & Vectors* .
- Lassen, S. B., Nielsen, S. A., Skovgard, H., & Kristensen, M. (2011). Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera:Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in Denmark. *Parasitology Research* , 823-829.
- Lee, J. H., Hassan, H., Geoff, H., Cupp, E. W., Higazi, T. B., Mitchell, C. J., y otros. (2002). Identification of Mosquito Avian-Derived Blood Meals by Polymerase Chain Reaction-Heteroduplex Analysis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 599-604.
- Lehan, M. (2005). *The Biology of blood-sucking insects*. United States of America: Cambridge University Press.
- Lehmann, K., Werner, D., Hoffman, B., & Helge, K. (2012). PCR identification od culicoid biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) of the *Obsoletus* complex including putative vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses. *Parasites & Vectors* , 1-9.
- Logan, J., Cook, J., Stancsyk, N., Weeks, E., Welham, S., & Mordue, A. (2010). To bite or not to bite! A questionnaire-based survey assessing why some people are bitten more than others by midges. *BMC Public Health* .
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., & Mohtarami, F. (2009). Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases* , 8-18.
- Manock, S. R., Jacobsen, K. H., Brito de Bravo, N., Russell, K. L., Negrete , M., & Olson, J. (2009). Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. *The American Society of tropical Medicine and Hygiene* , 146-151.
- Marino, P. I., Cazorla, C. G., & Ronderos, M. M. (2013). Study of the immature stages of two species of the biting midge genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta entomologica musei nationalis prae* , 777-792.
- Marquardt, W., Black, W., Freier, J., Hagedorn, C., Hemingway, J., Higgs, S., y otros. (2004). *Biology of Disease Vectors*. Massachusetts: Elsevier Academic Press.

- Martínez de la Puente, J., Martínez, J., Ferraguti, M., Morales-de la Nuez, A., Castro, N., & Figuerola, J. (2012). Genetic characterization and molecular identification of the bloodmeal sources of the potential bluetongue vector *Culicoides obsoletus* in the Canary Islands, Spain. *Parasites & Vectors* , 1-7.
- Martínez-de la Puente, J., Ruiz, S., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2013). Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector *Anopheles atroparvus*. *Malaria Journal* .
- Mayo, C., Mullens, B., Reisen, W., Osborne, C., Gibbs, P., Gardner, I., y otros. (2014). Seasonal and interseasonal Dynamics of bluetongue Virus Infection of dairy Cattle and *Culicoides sonorensis* Midges in Northern California - Implications for Virus Overwintering in Temperate Zones. *Plos One* .
- Meiswinkel, R., Labuschagne, K., Baylis, M., & Mellor, P. S. (2004). Multiple vectors and their differing ecologies: observations on two bluetongue and African horse sickness vector *Culicoides* species in South Africa. *Veterinaria Italiana* , 296-302.
- Meiswinkel, R., Venter, G. J., & Nevill, E. M. (2004). Vectors: *Culicoides* spp. En J. A. Coetzer, & R. C. Tustin, *Infectious Diseases of Livestock* (págs. 93-136). Cape Town: Oxford university Press.
- Mellor, P. S., Osborne, R., & Jennings, D. M. (1984). Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* spp. in the Sudan. *Journal of Hygiene* , 621-628.
- Menghi, C. I., Gatta, C. L., & Méndez, O. C. (2006). Detección Molecular de *Dientamoeba fragilis* en heces: eliminación de los inhibidores de la DNA polimerasa. *Parasitología Latinoamericana* , 146-151.
- Molaei, G., Andreadis, T., Armstrong, P., Anderson, J., & Vossbrinck, C. (2006). Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerging Infectious Diseases* .
- Mullen, G., & Durden, L. (2002). *Medical and Veterinary Entomology*. China: Academic Press.
- Muller, G., Dalavequia, M., Wagner, G., & Marcondes, C. (2014). Blood sucking Diptera (Culicidae, Psychodidae, Simuliidae) in forest fragment under impact of dam in the borderland of Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, Brazil. *Ciência Rural* , 1194-1196.
- Ngo, K. A., & Kramer, L. D. (2003). Identification of Mosquito Bloodmeals using Polymerase Chain Reaction (PCR) With Order-Specific Primers. *Journal of Medical Entomology* , 215-222.

- Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J.-C., Dufour, B., & Depaquit, J. (2011). Contribution to the knowledge of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. *Parasitology Research* , 657-663.
- Oem, J.-K., Chung, J.-Y., Kwon, M.-S., Kim, T.-K., Lee, T.-U., & Bae, Y.-C. (2012). Abundance of biting midge species (Diptera: Ceratopogonidae, Culicoides spp.) on cattle farms in Korea. *Journal of Veterinary Science* , 91-94.
- Okwa, O., Bello, B., & Olundegun, S. (2011). Human Host Preference of Anopheles mosquitoes collected from students hostels in a Nigerian University. *South Asian Journal of Experimental Biology* , 141-146.
- Ortíz, I., & León, L. A. (1955). *Los culicoides (diptera: ceratopogonidae) de la Republica del Ecuador*. Quito: Casa de la Cultura Ecuatoriana.
- Pages, N., Bréard, E., Urien , C., Talavera, S., Cyril, V., Lorca-oro, C., y otros. (2014). Culicoides Midge Bites Modulate the host Response and Impact on Bluetongue Virus Infection in Sheep. *Plos One* .
- Painter, R. H. (1927). *The Biology, Immature Stages, and Control of the Sandflies (Biting Ceratopogoninae) at Puerto Castilla, Honduras*. 15th Report Med. Department United Fruit Co.
- Patakakis, M. J., Papazahariadou, M., Wilson, A., Mellor, P. S., Frydas, S., & Papadopoulos, O. (2009). Distribution of Culicoides in Greece. *Journal of Vector Ecology* , 243-251.
- Petterson, E., Besch, S., Ander, M., Chirico, J., Sigvald, R., & Ignell, R. (2013). Molecular identification of bloodmeals and species composition in Culicoides biting midges. *Medical and Veterinary Entomology* , 104-112.
- Purse, B. V., Falconer, D., Sullivan, M. J., Carpenter, S., Mellor, P. S., Piernney, S. B., y otros. (2012). Impacts of climate, host and landscape factors on Culicoides species in Scotland. *Medical and Veterinary Entomology* , 168-177.
- Rawlings, P., Pro, M.-J., Pena, I., Ortega, M.-D., & Capela, R. (1997). Spatial and seasonal distribution of Culicoides imicola in Iberia in relation to the transmission of African horse sickness virus. *Medical and Veterinary Entomology* .
- Rimbaud, E., Pineda, N., Luna, L., Morales, X., Soto, J. L., & Rivera, G. (2005). *Parásitos diagnosticados por el Centro de Diagnóstico Veterinario de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Ciencias Comerciales, Nicaragua, ejercicio 2003-2005*. Costa Rica: Boletín de Parasitología, UNA.

- Russell, R., Otranto, D., & Wall, R. (2013). *The Encyclopedia of Medical & Veterinary Entomology*. CABI Publishing.
- Service, M. (2012). *Medical Entomology for Students*. New York: Cambridge University Press.
- Spinelli, G., Ronderos, M., Díaz, F., & Marino, P. (2005). The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro* , 137-150.
- Swami, K. K., & Srivasta, M. (2012). Blood Meal Preference of Some Anopheline Mosquitoes in Command and Non-Command Areas of Rajasthan, India. *Journal of Arthropod-Borne Disease* , 98-103.
- Swanson, D. (2012). Ecology and Phylogeny of the Biting-Midge Genus Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae). *Clemson: University Clemson* .
- Szadziewski, R., Krzywinski, J., & Gilka, W. (1997). Diptera Ceratopogonidae, biting midges. *Aquatic Insects of North Europe* , 243-263.
- Torr, S. J., & Hargrove, J. W. (1998). Factors affecting the landing and feeding responses of the tsetse *Glossina pallidipes* to a stationary ox. *Medical and Veterinary Entomology* , 196-207.
- Torres, A. (2014). Identificación molecular de las preferencias tróficas de género Culicoides en cinco Provincias del Ecuador. Tesis de pregrado de la carrera de Biotecnología - Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador .
- Uhlmann, K. R., Gibb, S., Stefan, K., Arroyo-Abad, U., Schulz, C., Hoffmann, B., y otros. (2014). Species determination of Culicoides biting midges via peptide profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Parasites & Vectors* , 1-18.
- Veggiani, C. A., Dantur, M. J., Santana, M., Lizzarralde, M. S., & Spinelli, G. R. (2012). The spatio-temporal distribution patterns of biting midges of the genus Culicoides in Salta province, Argentina. *Journal of Insect Science* .
- Veggiani, C. A., Dantur, M., Lizzarralde de Grosso, M., & Spinelli, G. (2011). Spatial and temporal distribution of culicoides insignis and culicoides paraensis in the subtropical mountain forest of Tucumán, northwestern Argentina. *Florida Epidemiologist* , 1018-1025.
- Venter, G. J., Paweska, J. T., Lunt, H., Mellor, P. S., & Carpenter, S. (2005). An alternative method of blood-feeding Culicoides imicola and other haematophagous Culicoides species for vector competence studies. *Veterinary Parasitology* , 331-335.
- Venter, J. G., Labuschagne, K., Boiknayo, S., & Morey, L. (2012). The effect of high frequency sound on Culicoides numbers collected with suction light traps. *Journal of the South African Veterinary Association* .

- Veronesi, E., Antony, F., Gubbins, S., Golding, N., Backwell, A., Mertens, P., y otros. (2013). Measurement of the Infection and Dissemination of Bluetongue virus in *Culicoides* Biting Midges Using a Smi-Quantitative RT-PCR Assay and Isolation of Infectious Virus. *PlusOne* .
- Viennet, E., Garros, C., Lancelot, R., Allene, X., Gardes, L., Rakotoarivony, I., y otros. (2011). Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera:Ceratopogonidae), vectors of Orboviruses. *Parasites & Vectors* , 1-12.
- Vijayakumar, K., Sudheesh, T., Nujum, Z., Umarul, F., & Kuriakose, A. (2014). A study on container breeding mosquitoes with special reference to *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes albopictus* in Thiruvananthapuram district, India. *Journal of Vector Borne Diseases* , 27-32.
- Walker, A. R. (1977). Seasonal fluctuations of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya. *Bulletin of Entomological Research* , 217-233.
- Wirth, W. (1951). The genus *culicoides* in alaska (Diptera, Heleidae). *Annals of the Entomological Society of America* , 75-86.
- Wirth, W. W., & Hubert, A. A. (1989). The *culicoides* of southeast asia (diptera:ceratopogonidae). *American Entomology Institute* .
- Wirth, W. W., Dyce, A. L., & Spinelli, G. R. (1988). An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the neotropical species of *culicoides* (Diptera:Ceratopogonidae). *Contrib. Amer. Ent. Inst* .
- Wittmann, E. J., & Baylis, M. (2000). Climate Change: Effects on *Culicoides* -Transmitted Viruses and Implications for the UK. *The Veterinary Journal* , 107-117.
- Yanase, T., Kato, T., Katagiri, Y., Aizawa, M., Nakamura, K., Kokuba, T., y otros. (2010). Isolation and characterization of Bluetongue virus from *Culicoides brevitarsis* (Diptera:Ceratopogonidae) in Okinawa. *Medical Entomology and Zoology* , 85-91.

12. TABLAS

Tabla 1. Lista de especies de culicoides con ingesta reciente de sangre y número de especímenes PNOC positivos.

Subgénero	Especie	Número de especímenes con ingesta de sangre	Número de muestras PNOC positivas
Hoffmania	<i>C. batesi</i>	1	1
Hoffmania	<i>C. diabolicus</i>	6	
Hoffmania	<i>C. filarifer</i>	3	1
Hoffmania	<i>C. fusipalpis</i>	5	3
Hoffmania	<i>C. guttatus</i>	30	12
Hoffmania	<i>C. hylas</i>	1	1
Haematomyidium	<i>C. equatoriensis</i>	1	
Haematomyidium	<i>C. ginesi</i>	1	
Haematomyidium	<i>C. glabrior</i>	7	3
Haematomyidium	<i>C. lahillei</i>	1	
Haematomyidium	<i>C. limonensis</i>	3	
Haematomyidium	<i>C. paraensis</i>	1	
Haematomyidium	<i>C. quasiparaensis</i>	4	
Haematomyidium	<i>C. spurius</i>	1	
Anilomyia	<i>C. metagonatus</i>	1	1
Diphomyia	<i>C. mirsae</i>	1	
Oecacta	<i>C. cancer</i>	1	
Miscelaneo No Definido	<i>C. discrepans</i>	1	
No definido	<i>C. bajensis</i>	1	
No definido	<i>C. beaveri</i>	1	
No definido	<i>C. belemensis</i>	1	
No definido	<i>C. benarrochi</i>	1	
No definido	<i>C. bricenoi</i>	1	
No definido	<i>C. castillae</i>	1	
No definido	<i>C. daedaloides</i>	1	
No definido	<i>C. dasyophrus</i>	73	18
No definido	<i>C. fieldi</i>	1	
No definido	<i>C. fluvialis</i>	1	
No definido	<i>C. leopoldoi</i>	20	1
No definido	<i>C. paucienfuscatus</i>	1	
No definido	<i>C. pifanoi</i>	4	1
No definido	<i>C. rangeli</i>	1	
No definido	<i>C. reticulatus</i>	10	1
No definido	<i>C. tetrathyris</i>	10	
TOTAL		197	43

Tabla 3. Lista de preferencias tróficas de especies de culicoides de la Estación de Biodiversidad Tiputini

Especie de Culicoides	Fuente de Alimento				
	<i>Ateles belzebuth</i>	<i>Homo Sapiens</i>	<i>Lagothrix poeppigii</i>	<i>Choloepus didactylus</i>	<i>Capra hircus</i>
<i>C. batesi</i>			1 ⁽⁴³⁾		
<i>C. dasyophrus</i>	18 ⁽⁴⁴⁾				
<i>C. filarifer</i>		1 ⁽¹⁾			
<i>C. fusipalpis</i>			3 ^(28,34)		
<i>C. glabrior</i>			1 ⁽³⁰⁾	2 ⁽³²⁾	
<i>C. guttatus</i>	1 ⁽⁴²⁾		10 ^(11, 13, 28, 42)		1 ⁽⁴²⁾
<i>C. hylas</i>				1 ⁽¹⁾	
<i>C. leopoldoi</i>				1 ⁽¹⁶⁾	
<i>C. metagonatus</i>			1 ⁽³⁰⁾		
<i>C. reticulatus</i>	1 ⁽¹⁾				
<i>C. pifanoi</i>			1 ⁽¹⁾		

* () Número de Trampa

Tabla 4. Lista de preferencias tróficas de los subgéneros de culicoides de la Estación de Biodiversidad Titupitini

Subgénero	Fuente de Alimento				
	<i>Ateles belzebuth</i>	<i>Homo Sapiens</i>	<i>Lagothrix poeppigii</i>	<i>Choloepus didactylus</i>	<i>Capra hircus</i>
Hoffmania	1	1	14	1	1
Haematomidium			1	2	
Anilomyia			1		
No definido	19		1	1	

13. FIGURAS

Figura 1. Ciclo de desarrollo del género *Culicoides*

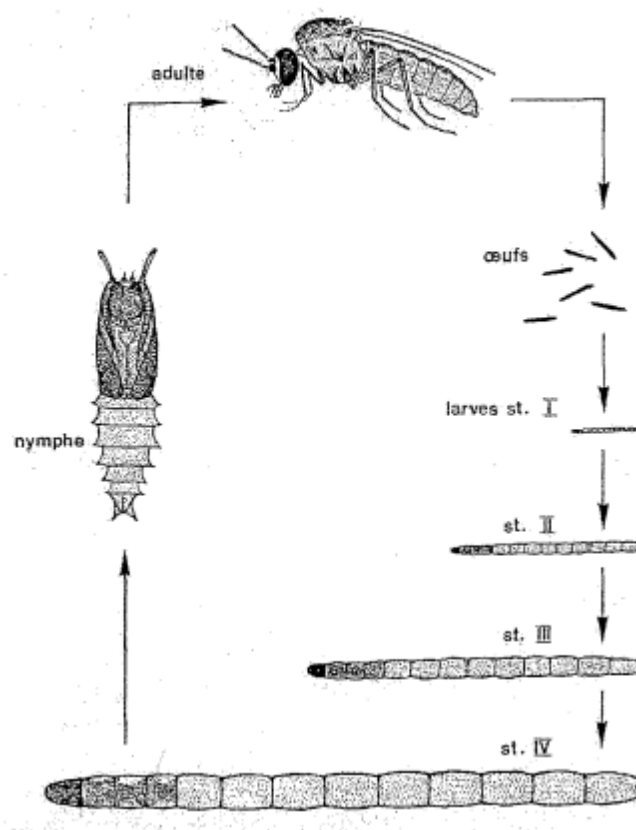


Figura 1. Etapas de Desarrollo de *Culicoides*.

oeufs: huevos; larves st I., st. II, st. III y st. IV: larvas en estadio I, II, III y IV; nymphe: ninfa o pupa; y, adulte: adulto. Tomada de Mihn, 2010.

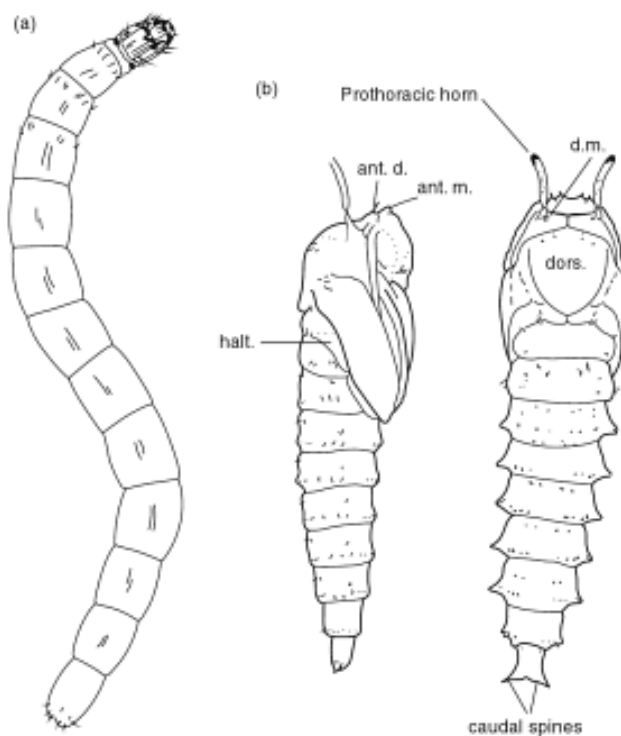


Figura 2. Diagrama de larva y pupa de *Culicoides*.

(a) Larva de *Culicoides impunctatus* (longitud 5.0mm): (b) vista lateral y dorsal de la pupa de *Culicoides nubeluscus*, ant.d., ant. M., d.m., y dors, indican las varias velocidades de la pupa.

Tomado y modificado de Russell, 2013.

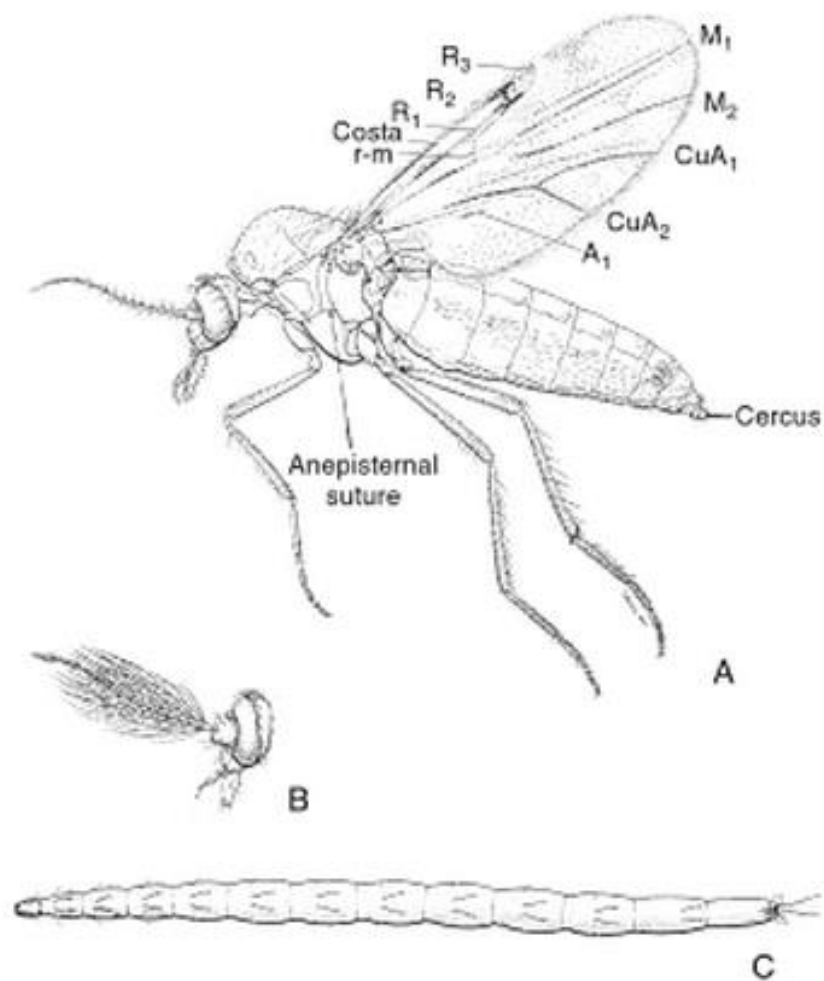
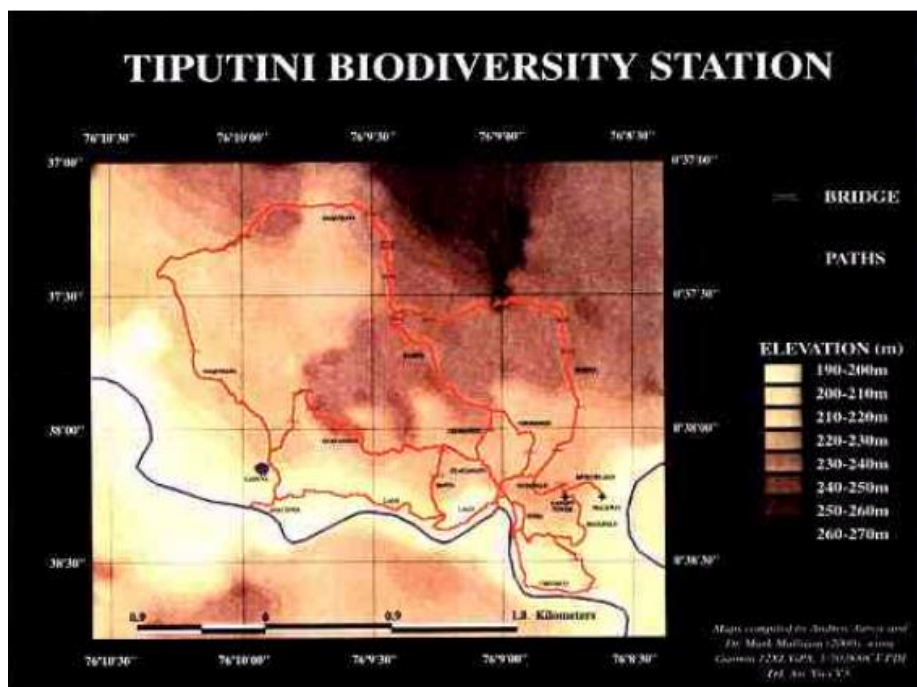


Figura 3. Diagrama de culicoides adulto

(A) Hembra adulta; (B) cabeza del macho; (C) larva

Tomado y modificado de Marquardt, 2004.

Figura 4. Mapa de la Estación de Biodiversidad Tiputini



Tomado y modificado de Cisneros, 2003.

Figura 5. Porcentaje total de hembras y machos culicoides.

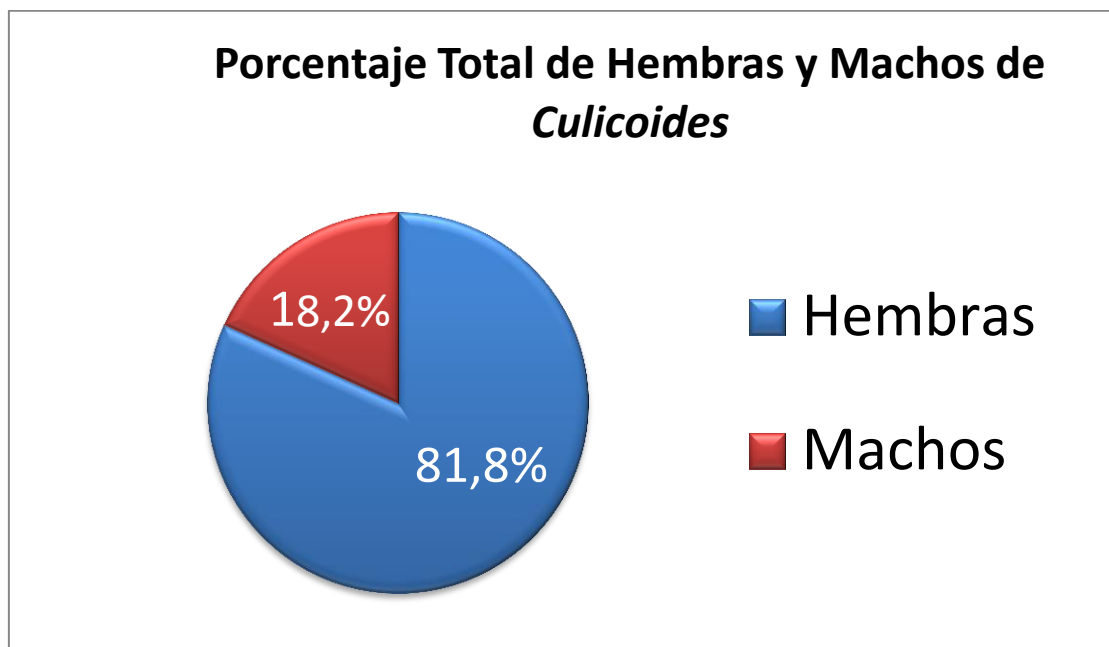


Figura 6. Porcentaje de hembras con sangre y hembras sin sangre de culicoides colectados

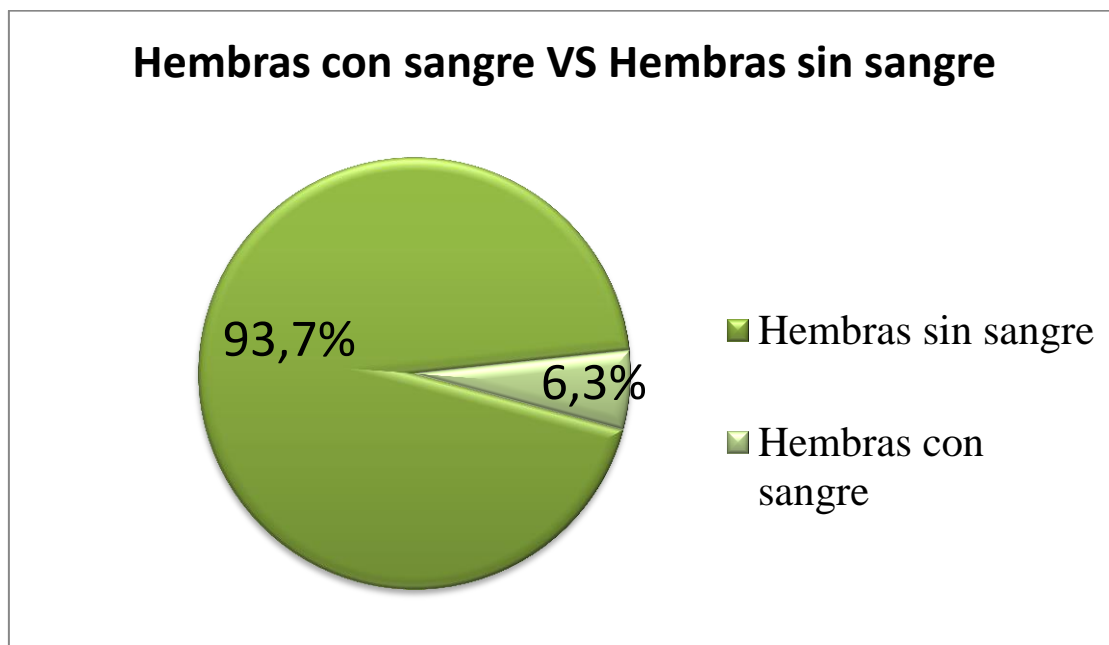
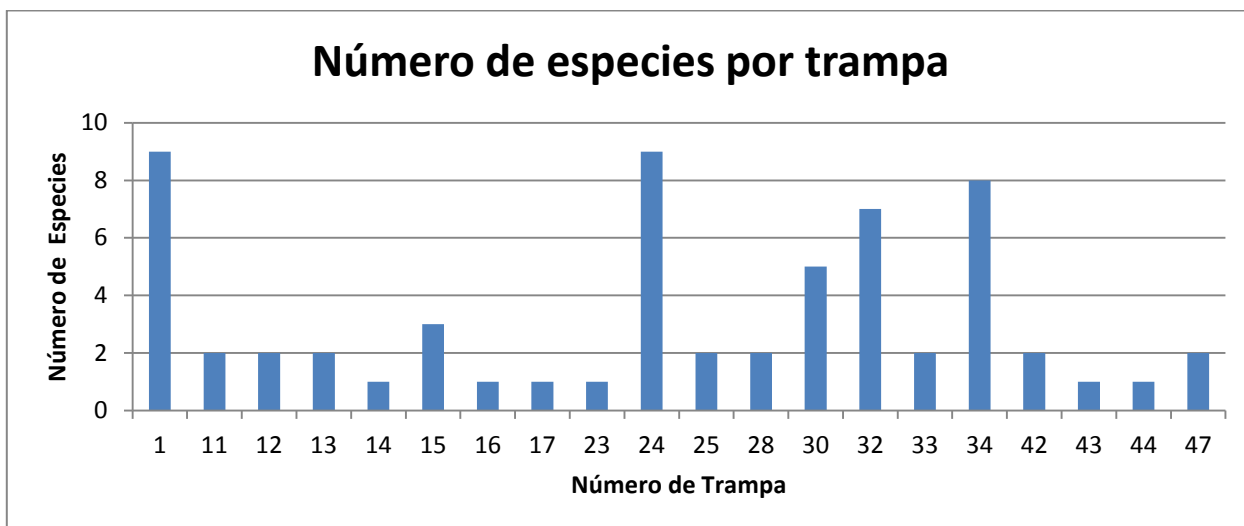
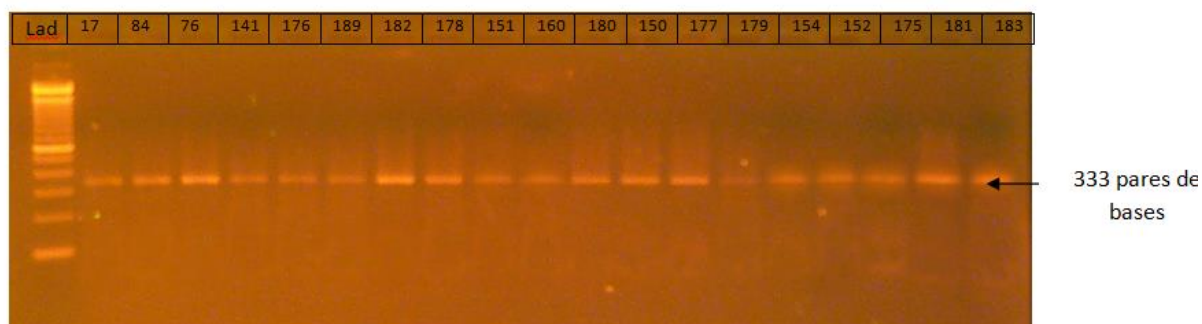


Figura 7. Número de especies del género *Culicoides* identificadas dentro de cada trampa



* Se colocó 47 trampas en la Estación de Biodiversidad Tiputini. La gráfica únicamente presenta datos de las trampas que tuvieron hembras con ingesta de sangre reciente.

Figura 8. Gel de Agarosa con la amplificación del gen PNOC



Lad = Ladder de ADN

* La numeración representa a los códigos de las muestras de ADN extraídas del abdomen de los culicoides con ingesta de sangre.

14. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de preparación del Master Mix de PCR para la amplificación de gen PNOC

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen para una Reacción	Volumen Total de Reacción
H2O para PCR			4,89 µl	97,8 µl
Buffer de PCR	5x	5x	2 µl	40 µl
MgCl ₂	25mM	25mM	1,2 µl	24 µl
dNTP's	1mM	1mM	0,7 µl	14 µl
Primer PNOC F	10 µl	50 µl	0,08 µl	1,6 µl
Primer PNOC R	10 µl	50 µl	0,08 µl	1,6 µl
Go Flexi® Taq Promega	5 U/µl	5 U/µl	0,05 µl	1 µl
Volúmen Total del Máster Mix			9 µl	180 µl
Volumen de ADN de sangre de culicoides	-----	-----	1 µl	